

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Adéla Šidlová

Analýza průběhu spermatogeneze u myši C57BL/6 po infekci prvokem *Toxoplasma gondii*
Analysis of spermatogenesis in mice C57BL/6 after *Toxoplasma gondii* infection

Diplomová práce

Školitelka: RNDr. Kateřina Hortová, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 28.dubna 2013

.....
Bc. Adéla Šidlová

Obsah

Obsah	3
Abstrakt	5
Abstract	6
Seznam zkratek	7
Úvod	9
1. Teoretická část	12
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	12
1.2. Spermatogeneze	14
1.2.1. Hormonální regulace spermatogeneze	16
1.3. Infekce a změna hladiny gonadotropních hormonů	18
1.3.1. Aktivace imunitního systému a produkce cytokinů	19
1.3.2. HPA stresová osa	19
1.4. Infekce a změna epigenetické modifikace DNA testikulární tkáně	22
1.4.1. DNA metylace	22
1.4.2. Spermatogeneze a genová exprese	25
2. Cíle diplomové práce	35
3. Experimentální část	36
3.1. Přístrojové vybavení a použité materiály	36
3.1.1. Přístrojové vybavení	36
3.1.2. Použité chemikálie	36
3.1.3. Roztoky	37
3.1.4. Pokusná zvířata	38
3.1.5. Infekce	38
3.2. Metody	39
3.2.1. KFR test (Komplement fixační reakce)	39
3.2.2. Odběr moči	40
3.2.3. Odběr krve	40
3.2.4. Histometrická analýza	40
3.2.5. Měření hladiny LH hormonu	42
3.2.6. Izolace DNA	43
3.2.7. Analýza globální metylace	44
3.2.8. Analýza specifické metylace	46

3.2.9. Statistické metody	53
4. Výsledky	55
4.1. Histometrická analýza testikulární tkáně	55
4.2. Detekce hladiny gonadotropního hormonu LH	61
4.3. Analýza epigenetické modifikace DNA v testikulární tkáni	62
4.3.1. Analýza globální metylace DNA testikulární tkáně	63
4.3.2. Analýza specifické DNA metylace genů regulujících spermatogenezi	67
5. Diskuze	75
6. Závěr	82
Literatura	84

Abstrakt

Toxoplasma gondii je celosvětově rozšířený intracelulární parazit, který způsobuje onemocnění zvané toxoplazmóza u 10-80% světové populace v závislosti na geografické poloze. Infekce tímto parazitem vyvolává změny v chování i fyziologických funkcích infikovaného hostitele, mezi které patří teplokrevní živočichové včetně člověka. V posledních letech bylo provedeno také několik studií, které poukazují na vliv infekce parazitem *T.gondii* na reprodukční schopnosti myších a potkaních samců, což je otázka, kterou jsem se zabývala v mé práci. V rámci mé práce jsem provedla detailní histometrickou analýzu testikulární tkáně, detekci hladiny LH hormonu v moči a analýzu epigenetické modifikace testikulární DNA u infikovaných a kontrolních myších samců. Po 30-denní infekci *T.gondii* bylo u infikovaných jedinců detekováno celkové snížení testikulární funkce a produkce spermií. U infikovaných jedinců došlo k poklesu hladiny LH hormonu v moči v porovnání s jedinci kontrolními a byl detekován pokles v počtu primárních spermatocytů a spermatid a zvýšený počet Sertoliho buněk a větší průměr semenotvorných kanálků. V rámci analýzy epigenetické modifikace DNA byl testikulární epigenom testován na míru globální metylace a míru specifické metylace genů *Hspa1*, *Crem* a *Creb1*, které jsou nezbytné pro správný průběh spermatogeneze. Na globální úrovni metylace testikulární DNA nebyl mezi skupinami zaznamenán statisticky významný rozdíl, ale byly detekovány rozdíly ve specifické metylaci vybraných genů. U genu *Hspa1* došlo u infikované skupiny ke zvýšení metylace, u *Crem* a *Creb1* naopak k poklesu metylace oproti kontrolním jedincům. Výsledky histometrické i epigenetické analýzy společně poukazují na spojení mezi infekcí *T. gondii* a poklesem reprodukčních schopností u myších samců.

Klíčová slova: *Toxoplasma gondii*, spermatogeneze, histometrická analýza, metylace testikulární DNA, *Hspa1*, *Crem*, *Creb1*

Abstract

Toxoplasma gondii is an intracellular parasite that causes a persistent infection in 10-80% of the world's population, depending on geographic location. Infection with this parasite causes changes in behavior and physiological functions of an infected host, including warm-blooded animals including humans. Recent studies also show influence of infection with *T.gondii* on male reproductive fitness in mice and rat and to investigate this issue further became a task of my diploma thesis. In this study, detailed histometric screening of testicular function along with levels of a pituitary luteinizing hormone (LH) and screening of epigenetic modification of testicular DNA were analysed in infected and control mice. Testicular function and sperm production was significantly decreased in *T. gondii* positive group after a 30-day infection. The level of LH in urine of *T. gondii* infected mice was decreased compares to control and the number of leptotene primary spermatocytes and spermatids was lowered, but also number of Sertoli cells and tubule diameter were elevated. In epigenetic study the testicular epigenom was tested to measure global methylation and methylation of specific genes *Hspa1*, *Crem* and *Creb1* which are essential for successfully ongoing spermatogenesis. The global level of methylation of testicular DNA was not statistically different between toxoplasma positive and negative group, but the differences were detected in the specific methylation of selected genes. Methylation of *Hspa1* was elevated in toxoplasma positive group, but methylation of *Crem* and *Creb1* was decreased compares to control group. These findings demonstrate a direct relation between *T. gondii* infection and decreased male reproductive fitness in mice.

Key words: *Toxoplasma gondii*, spermatogenesis, histometric analysis, testicular DNA methylation, *Hspa1*, *Crem*, *Creb1*

Seznam zkratek

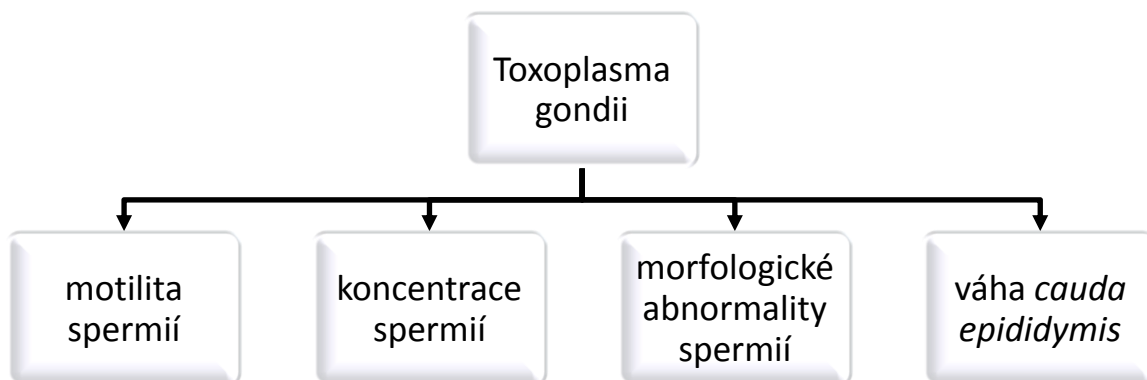
AC	adenylát cykláza
ACT	aktivátor CREM proteinu ve varlatech
ACTH	adrenokortikotropní hormon
AdCREBm1	mutantní adenovirová forma CREB proteinu
AIDS	syndrom získaného selhání imunity
APS	adenosin5-fosfosulfát
AR	androgenní receptor
ATP	adenosintrifosfát
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CBP	CREB-vázající protein
CD4+	pomocné T-lymfocyty
CD8+	pomocné T-lymfocyty
CD40	povrchový protein antigen prezentujících buněk
CD40L	povrchový protein aktivovaných T-lymfocytů
CRE	cAMP responzivní element
CREB	protein vázající cAMP element, transkripční faktor
CREM	modulátor cAMP responzivních elementů, transkripční faktor
CRF	kortikotropin uvolňující faktoru
DC	dendritické buňky
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	dvouřetězcová DNA
ssDNA	jednořetězcová DNA
DNMT	DNA metyltransferáza
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
ERK	kinázy regulované extracelulárním signálem
FSH	folikuly stimulující hormon
GABA	kyselina gama-aminomáselná
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GnRH	gonadotropiny uvolňující hormon
HCG	lidský choriový gonadotropin
HPA	osa hypothalamus- hypofýza- kůra nadledvin
HPG	osa hypothalamus- hypofýza- gonády
HSC70T	specifický testikulární protein teplotního šoku (heat shock cognate protein)
HSP70	rodina proteinů teplotního šoku (heat shock proteiny)
Hspa1	gen kódující HSC70T protein
ICER	inducibilní cAMP časný represor
I-CREB	inhibitorová forma CREB
IFN-γ	interferon γ
IL-1,6, 10, 12..	interleukin 1,6, 10,12..
index250	počet leptotenních spermatocytů na 250 Sertoliho buněk
KFR	komplement fixační reakce
KIF17	specifický kinezín germinálních buněk
LH	luteinizační hormon
LS	leptotenní spermatocyt
MAPK	mitogeny aktivovaná protein kináza
MHC II	povrchové glykoproteiny II. třídy
mRNA	messenger RNA

NF-κB	jaderný faktor- κ B
NK buňky	„natur killer“ buňky, lymfocyty
NO	oxid dusnatý
PCR	polymerázová řetězová reakce
PKA	protein kináza A
PM	plazmatická membrána
POMC	pro-opiomelanokortin
PPi	pyrofosfát
PR	průměr semenotvorného kanálku
S	spermatida
SB	Sertoliho buňka
SCF	stem cell factor (faktor kmenových buněk)
SEM	střední chyba průměru
SZÚ	Státní zdravotní ústav
TFIIB	transkripční faktor II B
TGF-β	transformující růstový faktor β
TNF-α	tumor necrosis faktor α
TSH	thyroidní stimulační hormon
UHRF1	ligáza (Ubiquitin-like s PHD a ring finger doménou1)
5mC	5-metyl cytosin

Úvod

Pod pojmem *Toxoplasma gondii* si většina lidí představí „něco“, co je přenášeno kočkou a že je to nebezpečné pro těhotné ženy. Tato představa je sice správná, kočka je definitivním hostitelem tohoto parazita a oocysty, které kočka vylučuje, jsou jedním ze zdrojů infekce člověka a kongenitální infekce plodu během těhotenství může být pro plod životohrožující, nicméně vzhledem k vysoké četnosti infekce v lidské populaci, je kolem tohoto parazita ještě celá řada aspektů, které si zaslouží pozornost. Již v minulosti bylo dokumentováno, že *T. gondii* moduluje chování myšího meziphostitele, aby zvýšila šanci svého přenosu do definitivního hostitele, kočky (Webster et al. 1994). V následujících letech, byly publikovány studie, které poukazují i na modulaci lidského chování při infekci *T.gondii* (Flegr et al. 1996; Torrey et al. 2007; Miman et al. 2010).

Otázkou, kterou jsem se v mé práci zabývala já, je vliv infekce parazitem *T. gondii* na reprodukční parametry samců myší kmene C57BL/6. Důvod, proč se této otázce věnovat, poskytuje několik studií, které poukazují na vliv infekce na reprodukční schopnost samců potkanů, myší i lidí. Terpsidis et al. (2009) ve své práci dokumentoval u infikovaných samců potkanů snížení motility spermií a jejich koncentrace, zvýšení výskytu abnormalit spermií a pokles váhy cauda epididymis, což jsou parametry, které odrážejí kvantitu i kvalitu produkce spermií a tedy celkovou reprodukční fitness samce (Obr. 1). Vedle této studie byly provedené další studie ukazující, že infekce parazitem snižuje motilitu i u lidských spermií (Zhou et al. 2003) a u infikovaných myších samců dochází při infekci ke zvýšené apoptóze spermatických buněk (Yang et al. 2006).



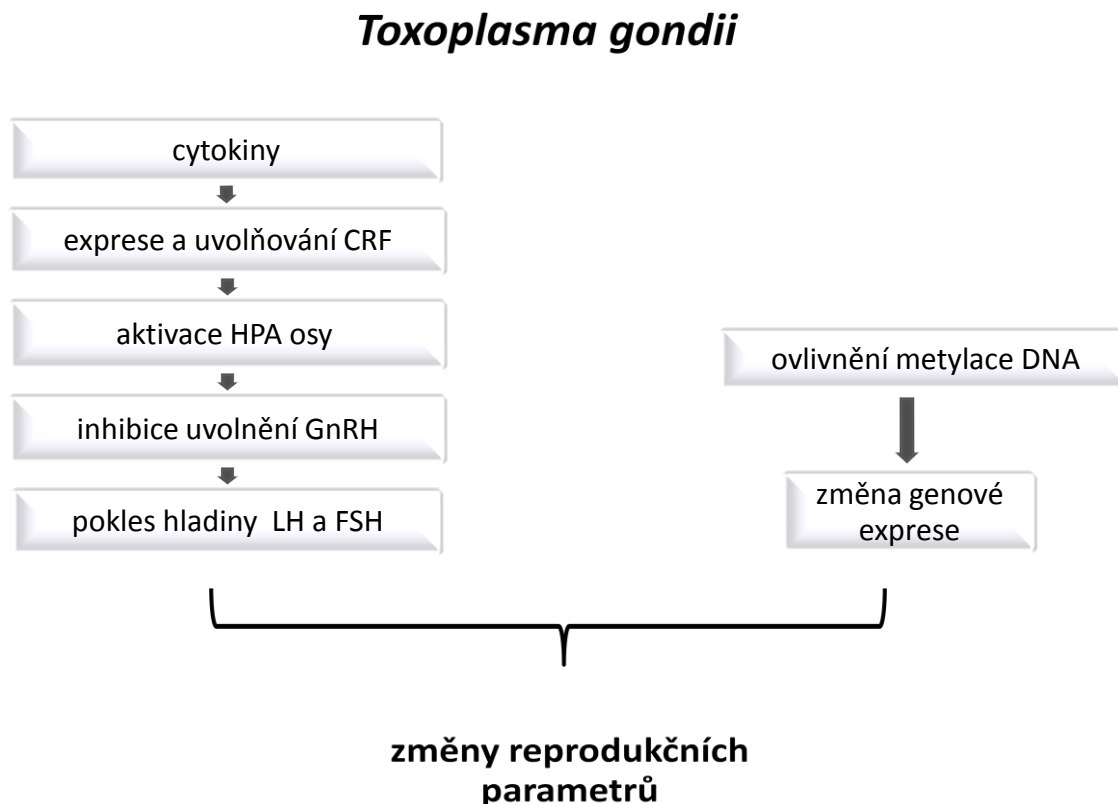
Obr. 1 Vliv infekce parazitem *Toxoplasma gondii* na reprodukční parametry samců

Otázkou zůstává, jakým mechanismem *Toxoplasma gondii* tyto změny způsobuje. V mé práci jsem se zabývala dvěma možnými hypotézami, které souvisí se změnou hladiny gonadotropních hormonů, a nebo se změnou exprese genů regulujících spermatogenezi z důvodu změněné epigenetické modifikace.

První hypotéza zahrnuje fakt, že stresová situace, kterou infekce parazitem *Toxoplasma gondii* pro tělo představuje, vede k aktivaci osy hypothalamus-hypofýza-kůra nadledvin (HPA) a k uvolnění stresových hormonů, které spolu s cytokiny, které jsou uvolněny aktivovanými buňkami imunitního systému, mohou aktivovat kaskádu procesů a způsobit pokles hladiny gonadotropních hormonů- luteinizačního hormonu (LH) a folikuly stimulujícího hormon (FSH) a narušit tak hormonální regulaci reprodukce (Obr. 2) (Rivier and Rivest 1991). Terpsidis et al. (2009) ve své práci navrhl, že *T.gondii* může prostřednictvím periferních cytokinů zvýšit uvolňování kortikotropin-uvolňujícího faktoru (CRF, neuropeptid regulující stresovou reakci) neurony hypothalamu a inhibovat tak uvolňování gonadotropin-uvolňujícího hormonu (GnRH) z hypothalamu a následně vést k nedostatečnému uvolňování gonadotropinů z hypofýzy. Tento navrhnutý mechanismus ovšem nebyl dále testován a spojení mezi toxoplasmózou a modifikací hladiny gonadotropinů nebylo prokázáno. V první části mé práce jsem testovala kvalitu spermatogeneze po 30-denní akutní fázi infekce detekcí hladiny LH hormonu v moči a následnou detailní morfometrickou analýzou testikulární tkáně.

Druhá hypotéza zahrnuje ovlivnění epigenetické modifikace DNA, konkrétně metylace DNA a tím i exprese genů ovlivňujících spermatogenezi. Methylace DNA je epigenetická modifikace, která je v buňkách germinální linie unikátní a její abnormality jsou asociovány s poruchami ve spermatogenezi (Doerksen and Trasler 1996; Doerksen et al. 2000; Kelly et al. 2003; Wu et al. 2010), přičemž některé z těchto poruch byly pozorovány právě u samců s narušenou reprodukční funkcí po infekci *T.gondii*. Epigenetickou modifikací hostitelské DNA patogenem se zabývá nově se vyvíjející vědní obor, patho-epigenetika, která poukazuje na to, že někteří parazité jsou schopni vyvolat epigenetické změny pro zajištění svého přežití a replikace uvnitř hostitele a únik imunitnímu systému (Minárovits 2009; Angrisano et al. 2010; Paschos and Allday 2010). V druhé části práce jsem testovala testikulární epigenom na míru globální metylace a míru specifické metylace genů regulujících spermatogenezi *Hspa1*, *Crem* a *Creb1*. Tyto geny jsou důležité pro správný průběh spermatogeneze, jejich aktivita je regulována gonadotropními hormony a jejich promotory obsahují CpG dinukleotidy, takže je možná regulace jejich exprese pomocí metylace DNA

(Don and Stelzer 2002; Eddy 2002; Nanassy and Carrell 2011), navíc defekty spermatogeneze způsobené narušením exprese těchto genů se shodují s defekty pozorovanými u infikovaných jedinců (Obr. 2).



Obr. 2 Možné mechanismy vlivu infekce na reprodukční parametry samců

Poznatky z obou částí naznačují, že *Toxoplasma gondii* může narušením sekrece gonadotropních hormonů také měnit expresi genů regulujících spermatogenezi a následně narušit spermatogenezi a snížit reprodukční fitness infikovaného samce. Z čehož vyplývá, že mechanismy, jehož prostřednictvím *T.gondii* modifikuje hostitelskou homeostázu jsou složité a k jejich poznání je potřeba dalších studií.

1. Teoretická část

1.1. *Toxoplasma gondii*

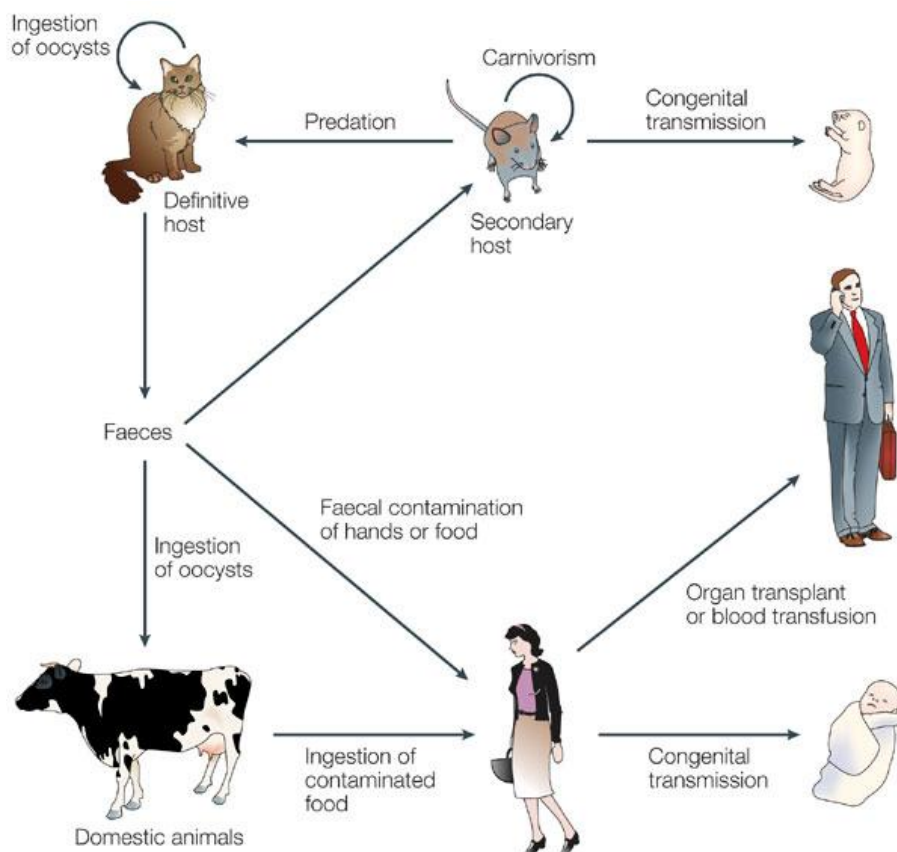
Toxoplazmóza, onemocnění způsobené protozoálním parazitem *Toxoplasma gondii*, je jednou z nejčastějších parazitárních infekcí člověka a teplokrevných živočichů (Hill and Dubey 2002). U většiny imunokompetentních jedinců je infekce tímto parazitem charakterizována asymptomatickou latentní infekcí v centrálním nervovém systému a kosterní svalovině. Infekce je kontrolována imunitním systémem, parazit vytváří cysty, které zůstávají trvale v hostitelských tkáních a pokud dojde k imunosupresi, mohou prasknout a reaktivovat onemocnění (Montoya and Liesenfeld 2004; Radke et al. 2007).

Život ohrožující může infekce být pro vyvíjející se plod a pro jedince s onemocněním AIDS, ale také pro pacienty podstupující chemoterapii nebo ošetření imunosupresivními léky, u kterých může dojít k reaktivaci parazita, jeho nekontrolovatelné replikaci a těžkým encefalitidám, retinitidám, myokarditidám a v nejhorším případě k smrti jedince (Montoya and Liesenfeld 2004; Radke et al. 2007; Blader and Saeij 2009; Feustel et al. 2012). Nitroděložní infekce v prvním trimestru je nejčastější příčinou vrozených vad způsobených infekcí. Odhaduje se, že 85% žen v plodném věku je náchylných k primární infekci prvkem *Toxoplasma gondii* a může u nich dojít k přenosu infekce na plod, k aborci plodu či vývoji vrozené toxoplazmózy (Tenter et al. 2000; Radke et al. 2007).

Během životního cyklu prochází *Toxoplasma gondii* různými vývojovými etapami, které se pohybují mezi definitivním hostitelem- kočkovitou šelmou, ve které dochází k sexuálnímu rozmnožování a tvorbě pohlavních buněk a oocyst a množstvím meziphostitelů, ve kterých dochází k asexuálnímu rozmnožování a vzniku stádia tachyzoitů a bradyzoitů (Dubey 2004; Radke et al. 2007). Oocysty dokončují vývoj mimo tělo a stávají se infekční pro asi 350 druhů obratlovců, včetně koček a člověka. Infekčnost a patogenita oocyst se pro jednotlivé živočišné druhy liší (Fayer 1981). Na rozdíl od ostatních parazitů ze skupiny *Apikomplexa*, může být *T. gondii* přenášena mezi meziphostiteli vertikálním přenosem (z matky na plod) nebo horizontálním přenosem (karnivorismem) (Blader and Saeij 2009). Díky možnosti přenosu mezi meziphostiteli je *T. gondii* celosvětově rozšířená a toxoplazmóza jednou z nejčastějších zoonóz na světě (Stifko et al. 2000; Blader and Saeij 2009). Oocysty vstupující do životního prostředí jsou jedním ze zdrojů infekce u lidí a také mohou kontaminovat půdu nebo zásoby vody, což v minulosti vedlo k lidským epidemiím. Oocysty jsou také hlavním zdrojem infekcí hospodářských zvířat určených k porážce a lidské spotřebě.

V savčích hostitelích se tachyzoity rychle replikují, vyvolávají akutní fázi onemocnění a mohou konvertovat v bradyzoity a tkáňové cysty zodpovědné za chronickou fázi infekce. Chronická fáze infekce může přetrvávat po celou dobu života hostitele (Fayer 1981; Radke et al. 2007).

Infekce meziphostitele i definitivního hostitele parazitem *Toxoplasma gondii* je možná několika způsoby: A) horizontálně- požitím infekčních oocyst z životního prostředí (z kontaminovaných rukou nebo jídla), (B) horizontálně- požitím tkáňových cyst obsažených v syrovém nebo nedostatečně tepelně upraveném mase meziphostitelů, nebo (C) transplacentárním přenosem z infikované matky na plod. Životní cyklus může pokračovat do nekonečna přenosem tkáňových cyst mezi meziphostiteli (i bez definitivních hostitelů) a také přenosem oocyst mezi definitivními hostiteli (i bez meziphostitelů) (Tenter et al. 2000). U člověka jsou ještě dvě, méně časté, ale možné cesty infekce a to transplantace orgánů nebo krevní transfúze od infikovaných lidí (Aliberti 2005) (Obr. 3).



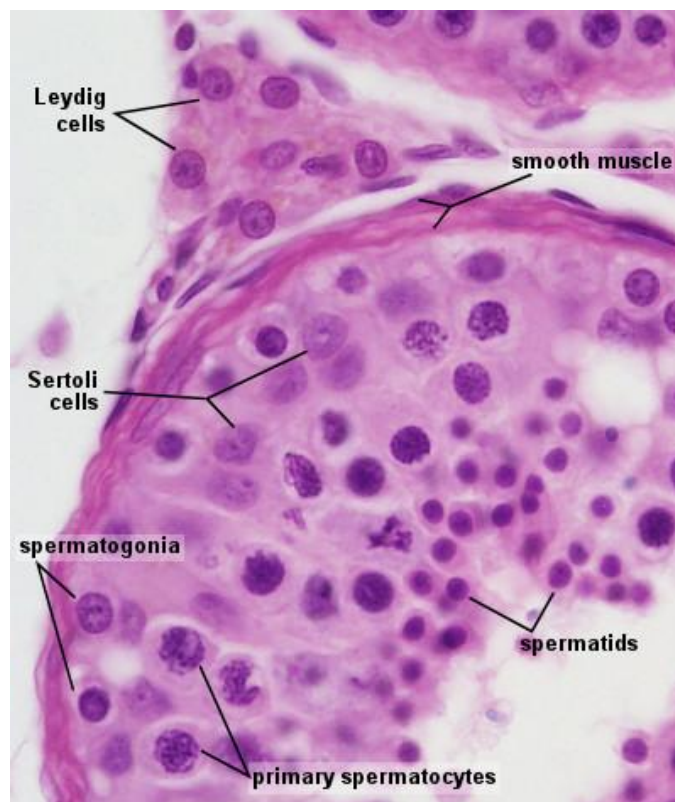
Obr. 3 Možné cesty infekce člověka parazitem *Toxoplasma gondii* (Aliberti 2005)

Během procesu šíření parazita v těle *Toxoplasma gondii* nejprve prochází přes střevní epitel a šíří se do hlubokých tkání epiteliální nebo endoteliální vrstvy a vstup do oběhu je zásadní událost pro parazita, která umožňuje jeho šíření, přičemž jakmile je parazit v krvi nebo v lymfatickém systému, je chráněn před několika mikrobicidními buněčnými a humorálními faktory, jejichž cílem je zabít extracelulární patogeny (Derouin and Garin 1991; Dubey 1997; Zenner et al. 1998)

1.2. Spermatogeneze

Spermatogeneze je proces vývoje samčích pohlavních buněk- spermií z nediferencovaných germinálních buněk. Tento proces zahrnuje postupnou mitotickou, meiotickou a postmeiotickou fázi. Během tohoto složitého procesu se kulaté nediferencované spermatogonie prodlužují a terminálně diferencují ve spermie, což jsou vysoce specializované buňky zodpovědné za vnesení paternálního genomu do vajíčka při procesu oplození. Spermatogeneze vyžaduje přesně a dobře koordinovaný systém, který reguluje neustále se měnící vzorce genové exprese (Huang and Sha 2011).

Spermatogeneze probíhá v testikulární tkáni, přičemž savčí varlata se skládají ze dvou kompartmentů- kulatých semenotvorných kanálků a intersticiální tkáně. Intersticiální tkáň je zodpovědná za krevní podporu, imunologickou odpověď a obsahuje Leydigovy buňky, které zprostředkovávají testikulární tkáni endokrinní hypofyzární signály. Leydigovy buňky jsou většinou těsně přilehlé ke krevním cévám a semenotvorným kanálkům, produkují testosteron a spoluúčastní se na řízení spermatogeneze. Semenotvorné kanálky obsahují Sertoliho buňky a vyvíjející se buňky germinální linie. Tyto buňky jsou obklopeny bazální laminou, kterou produkují nad ní ležící peritubulární epiteliální buňky, jejichž funkcí je kontrakce nezbytná pro pohyb nemotilních nezralých spermií z kanálků do nadvarlete. Polarizované Sertoliho buňky jsou ukotveny na bazální laminu a vytváří bariéru mezi krví a testes díky přítomnosti nepropustných mezibuněčných spojů a poskytují tak izolované prostředí potřebné pro rozvoj pohlavních buněk. Sertoliho buňky také fungují jako přenašeči androgenních signálů do germinálních buněk (Wistuba et al. 2007; Ge et al. 2009; Jamsai and O'Bryan 2011) (Obr. 4).



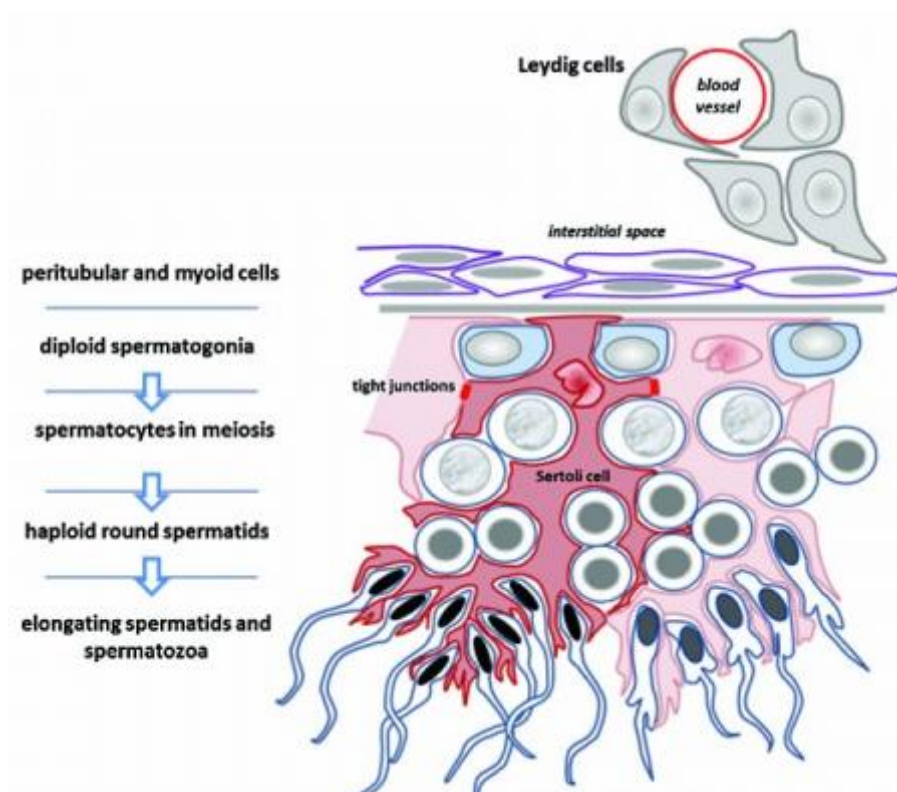
Obr. 4 Semenotvorný kanálek

(http://php.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=File:Testis_histology_2.jpg)

Dlouhá cesta od spermatogoniálních kmenových buněk k funkčním spermii zahrnuje mnoho kroků a spolupráci mnoha typů buněk. Spermatogeneze zahrnuje procesy specifické pro germinální buňky, jako je meióza, genetická rekombinace, haploidní exprese genů, formování specifických struktur spermii a přestavba a kondenzace chromatinu. Nezralé germinální buňky, spermatogonie, procházejí před konverzí ve spermatocyty mitotickým dělením a spermatocyty poté vstupují do meiotického dělení za vzniku haploidních kulatých spermatid. Tyto buňky podstupují sérii diferenciačních událostí a vznikají tak prodloužené spermatidy. Všechny tyto kroky vyžadují přímý kontakt vyvíjejících se germinálních buněk se Sertoliho buňkami, které zajišťují výživu a podporu. Po dokončení buněčné diferenciace jsou nezralé spermie uvolněny ze semenotvorných kanálků a přecházejí do nadvarlat. Zde jsou vystaveny kyselému mikroprostředí a různým sekrečním proteinům, které jsou nezbytné pro jejich kompletní maturaci ve zralé spermie a pro jejich dlouhodobé skladování v klidovém stavu (Eddy 2002; Bettegowda and Wilkinson 2010).

Během procesu spermatogeneze se germinální buňky pohybují z periferie do lumen semenotvorných kanálků. Mitotická fáze spermatogeneze se odehrává v bazálním prostoru, zatímco meiotické a postmeiotické fáze se odehrávají v lumen kanálku. Proces spermatogeneze trvá u myši asi 35 dní, kdy mitotické fáze trvají přibližně 11 dní, meiotické

fáze přibližně 10 dní a postmeiotická fáze přibližně 14 dní. Proces začíná každých 8.7-8.9 dní. (Eddy 2002) (Obr. 5).



Obr.5 Schéma spermatogeneze

(http://php.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=ANAT2341_Lab_1_-_Spermatogenesis)

1.2.1. Hormonální regulace spermatogeneze

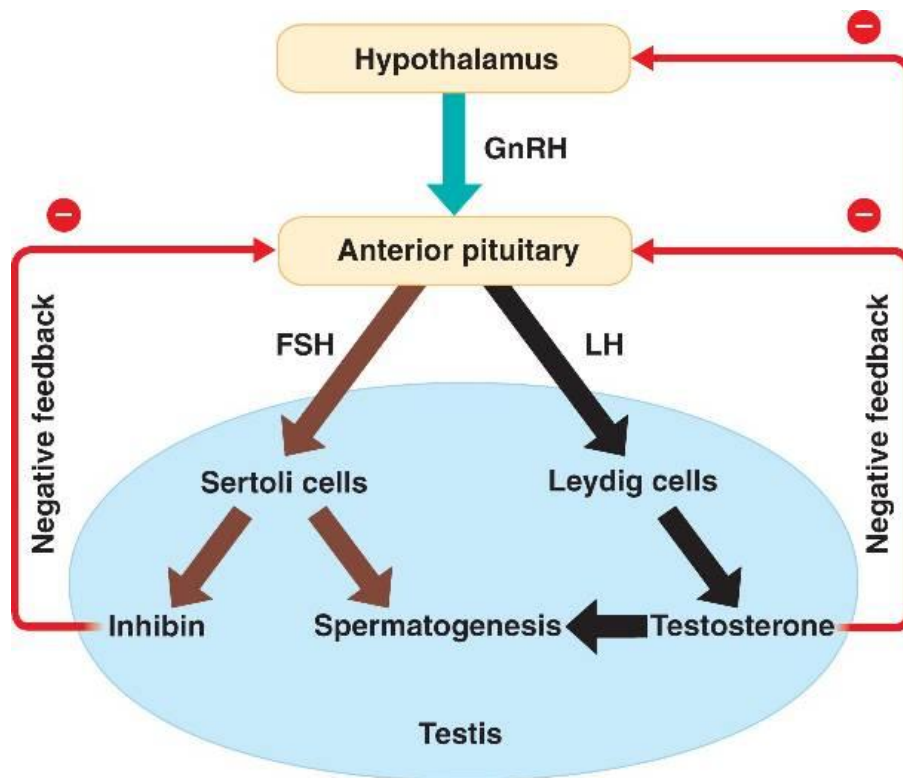
Regulaci procesu spermatogeneze můžeme rozdělit do tří úrovní: vnitřní, interaktivní a vnější. Vnitřní regulace je řízena evolučně zachovaným genetickým programem, který je základem vývoje buněk germinální linie různých druhů, od háďátek přes mouchy až k savcům. Tento program je zodpovědný za sled událostí diferenciaci a morfogeneze, který se odehrává v celém průběhu spermatogeneze. Interaktivní úroveň regulace vývoje germinálních buněk představuje reakci na vnější podněty, které ovlivňují genovou expresi somatických buněk testikulární tkáně (Sertoliho a Leydigovy buňky) a tím nepřímo ovlivňují genovou expresi v germinálních buňkách. Vnější úroveň regulace představuje endokrinní regulaci pomocí hypofyzárních hormonů a testosteronu (Eddy 2002).

Tvorba plně funkčních spermií je pod přísnou hormonální regulací. Regulace savčí spermatogeneze zahrnuje akci několika peptidových a steroidních hormonů, z nichž každý

hraje důležitou roli v normálním fungování epitelu semenotvorných kanálků. Správné fungování savčí testikulární tkáně je závislé na hormonálních poslech působících endokrinní, parakrinní a autokrinní cestou. Několik klíčových hormonů vylučovaných z hypothalamu (GnRH), hypofýzy (LH a FSH) a z varlat (androgeny, estrogeny, inhibin and follistatin) se účastní regulace spermatogeneze. Role gonadotropinů je zejména udržování správného fungování somatických buněk varlat, zatímco androgeny (testosteron), především regulují prostřednictvím somatických buněk diferenciaci buněk germinálních. Testosteron je zásadní pro podporu spermatogeneze, je vylučován Leydigovými buňkami po stimulaci LH a působí přes androgenní receptory na Sertoliho a Leydigových buňkách. Bylo prokázáno, že narušení hormonální regulace přispívá k samčí neplodnosti, a že odstranění hormonů osy hypothalamus-hypofýza-gonády (HPG) indukuje apoptózu germinálních buněk. (McLachlan et al. 2002; Holdcraft and Braun 2004; Sofikitis et al. 2008; Jamsai and O'Bryan 2011).

Hormonální poslované jsou velmi důležití nejen pro regulaci vývoje buněk germinální linie, ale i pro proliferaci a funkci somatických buněčných typů nezbytných pro správný vývoj varlat. Mezi ně patří intersticiální steroidogenní Leydigovy buňky, jejichž primární funkcí je produkce testosteronu, myoidní buňky, které obklopují semenotvorné kanálky a poskytují fyzickou podporu a kontraktilní pohyb těchto struktur a Sertoliho buňky, které mají přímý kontakt s proliferujícími a diferencujícími germinálními buňkami semenotvorných kanálků a mají zásadní význam pro zajištění fyzické i nutriční podpory spermatogeneze. Každý z těchto typů buněk je přímým cílem pro jeden nebo více hormonů, jejichž funkce jsou důležité pro zajištění plodnosti (Holdcraft and Braun 2004).

Endokrinní regulace spermatogeneze je založena na hormonech HPG osy. Z hypothalamu je uvolňován GnRH, který indukuje uvolnění gonadotropních hormonů LH a FSH z hypofýzy. LH stimuluje Leydigovy buňky k produkci a uvolnění testosteronu, zatímco FSH působí na Sertoliho buňky, které podporují buňky spermatogeneze a uvolňují inhibin, který spolu s testosteronem zpětně negativně ovlivňuje produkci gonadotropinů a GnRH (Wistuba et al. 2007) (Obr. 6).



Obr. 6 Hormonální regulace spermatogeneze

(<http://www.pharmacistsworld.com/forum/showthread.php?t=17120&page=12>)

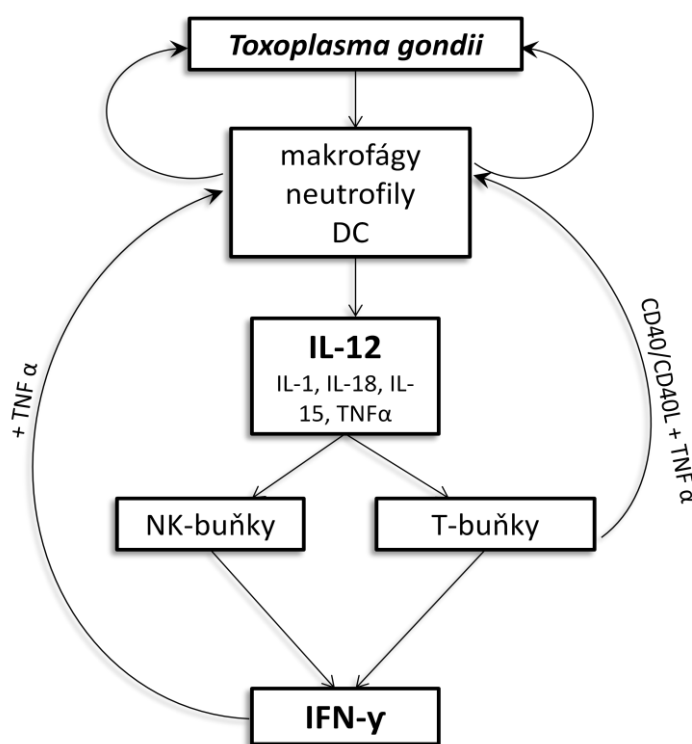
FSH a LH jsou glykoproteinové hormony, sdílejí společnou α -podjednotku a liší se hormon specifickou β -podjednotkou (Pierce and Parsons 1981). Exprese FSH receptoru je v testikulární tkáni omezena na Sertoliho buňky (Rannikko et al. 1995), zatímco LH receptory se nacházejí především v Leydigových buňkách, i když byly pozorovány také na buňkách spermatogenních (Eblen et al. 2001)

1.3. Infekce a změna hladiny gonadotropních hormonů

Infekce parazitem *Toxoplasma gondii*, zahrnující aktivaci imunitního systému a produkci cytokinů, představuje pro tělo hostitele stresovou událost. Schopnost stresu interferovat s reprodukční schopností je již dlouhou dobu lékaři uznávaná. Stres doprovází jak zvýšení aktivity HPA osy, tak snížení reprodukčních schopností, což poukazuje na možný vztah mezi hormony HPA osy (které se uvolňují při stresu) a hormony HPG osy, které ovlivňují reprodukční parametry jedince (Rivier and Rivest 1991). Interference hormonů mezi těmito drahami může být jedním z možných mechanismů, kterým infekce parazitem *T. gondii* ovlivňuje reprodukci.

1.3.1. Aktivace imunitního systému a produkce cytokinů

Buněčná imunita zprostředkovaná T-lymfocyty, NK-buňkami, dendritickými buňkami (DC) a makrofágy je nezbytná pro zvládnutí akutní fáze infekce a ustanovení chronické fáze onemocnění (Lambert and Barragan 2010). Makrofágy a NK-buňky jsou zodpovědné za první atak imunitního systému. Vyvolávají silnou Th1 imunitní odpověď, která je charakterizována vznikem specifických CD4+ a CD8+ T-buněk, které produkují interferon- γ (IFN- γ) a poskytují ochrannou imunitu. Infekce spouští produkci pro-zánětlivých (IFN- γ , IL-12, IL-6 a TNF- α) i proti-zánětlivých (TGF- β , IL-10) cytokinů (Obr. 7), přičemž některé z nich jsou schopny ovlivnit sekreci kortikotropin uvolňujícího faktoru (CRF) a podílet se na regulaci aktivity HPA stresové osy (Araujo 1991; Navarra et al. 1991; Silva et al. 2009; Dzierszinski and Hunter 2008)



Obr. 7 Nastavení buněčné imunity a produkce cytokinů po infekci parazitem *Toxoplasma gondii*

1.3.2. HPA stresová osa

Obecně platí, že stresory aktivují HPA osu a následná stresová reakce zahrnuje sekreci CRF z hypothalamu, který stimuluje adenohypofýzu k uvolnění adrenokortikotropního hormonu (ACTH), který vyvolává vylučování kortikosteroidů z kůry nadledvin (Moberg

1987; Rivier and Rivest 1991). Navíc kromě ACTH, může CRF stimulovat také uvolňování pro-opiomelanokortinu (POMC) z hypothalamu a hypofýzy (Gindoff and Ferin 1987).

Činnost neuronů uvolňujících CRF je převážně regulována třemi neurotransmitery: GABA, glutamátem a noradrenalinem (Levy and Tasker 2012). Ovšem exprese CRF ovlivňuje také cytokiny, které jsou produkovány aktivovanými buňkami imunitního systému při infekci prvokem *Toxoplasma gondii*. Zejména IL-6, je důležitým mediátorem interakce neuroendokrinního a imunitního systému a zvyšuje genovou expresi a uvolňování CRF z hypothalamu (Navarra et al. 1991). CRF funguje jako neuromodulátor centrální nervové soustavy, nicméně mechanismy, jejichž prostřednictvím CRF ovlivňuje uvolňování GnRH nejsou zcela objasněny (River and Rivest 1991).

CRF, ACTH a β -endorfin a nadledvinové kortikosteroidy hrají velmi důležitou roli efektu stresu na reprodukční funkci. Adaptivní odpověď na stres zahrnuje změnu vylučování CRF, ACTH a LH, stejně jako kortikosteroidů nadledvin Interference HPA a HPG osy (Rivier and Rivest 1991).

Od stresu odvozené hormony mohou ovlivňovat sexuální funkci na všech třech úrovních HPG osy: na úrovni hypothalamu (inhibice sekrece GnRH), na úrovni hypofýzy (uvolnění LH a FSH hormonů) a na úrovni gonád (modulace stimulačního účinku gonadotropinů na sekreci pohlavních steroidů) (Obr. 8).

1.3.2.1. Interakce na úrovni hypothalamu

Studie provedené na potkanech a ovčích ukazují na snížení plazmatické hladiny LH během stresu, nicméně s přetrvávající reakcí na exogenní GnRH, což potvrzuje, že vystavení stresu brání uvolnění GnRH z hypothalamu. Antagonista CRF ruší stresem indukovanou inhibici uvolňování LH, což potvrzuje, že CRF tuto inhibici zprostředkovává (Moberg 1985; Rivier et al. 1986). Inhibiční účinky na sekreci GnRH má také stresem indukované uvolňování β -endorfinů a dochází tak k poklesu koncentrace GnRH v hypofyzárním portálním systému (Delitala et al. 1981).

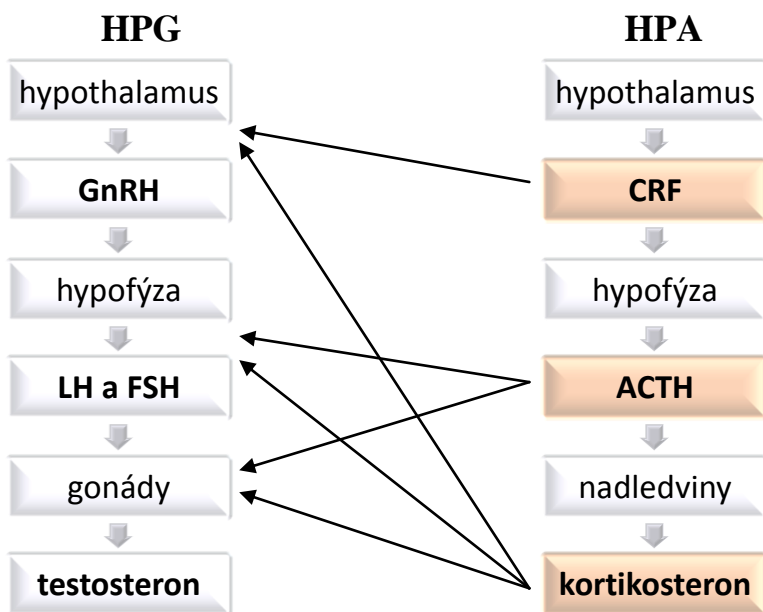
1.3.2.2. Interakce na úrovni hypofýzy

Hormony HPA osy mohou snížit schopnost hypofýzy reagovat na GnRH. U potkanů má injekce ACTH za následek zvýšení plazmatických hladin kortikosteronu a snížení hladiny LH, FSH a testosteronu, navíc kortikosteroidy dramaticky zvyšují negativní zpětnou vazbu testosteronu, čímž se snižuje sekrece GnRH, stejně jako gonadotropinů (Welsh and Johnson 1981; Vreeburg et al. 1984; Vreeburg et al. 1988).

Kromě kortikosteroidů, kůra nadledvin po stimulaci ACTH vylučuje progesteron, přičemž koncentrace endogenních kortikosteroidů a progesteronu se zdá být v negativní korelaci s hladinami LH a testosteronu, což naznačuje, že oba adrenokortikální steroidy se podílejí na modulaci produkce testosteronu (Vreeburg et al. 1984; Ward and Weisz 1984).

1.3.2.3. Interakce na úrovni testes

Jedním z prvních příznaků stresu u samců je snížení hladiny sérového testosteronu, přičemž hladina LH (hlavní regulátor sekrece testosteronu) může být stejná nebo nižší, v závislosti na délce trvání stresu. U potkanů akutní stres snižuje koncentraci testosteronu především na testikulární úrovni s nezměněnou sekrecí LH, zatímco chronický stres má inhibiční účinky na hypothalamo-hypofyzární úrovni a tím, že sníží uvolňování LH, snižuje sérovou koncentraci testosteronu (Marić et al. 1996). U potkanů byly dokumentovány přímé inhibiční účinky glukokortikoidů na testikulární LH-vazebnou kapacitu a tedy i na steroidogenezi, navíc existují důkazy, že Leydigovy buňky produkují POMC odvozené peptidy, které mohou působit jako autokrinní inhibitory testikulární steroidogeneze (Bambino and Hsueh 1981; Welsh et al. 1981; Mann and Wilson 1988).



Obr. 8 Interference HPG a HPA osy na úrovni hypothalamu, hypofýzy i gonád

1.4. Infekce a změna epigenetické modifikace DNA testikulární tkáně

Druhým mechanismem, kterým *Toxoplasma gondii* může měnit reprodukční parametry, je epigenetická modifikace hostitelské DNA a tím změna exprese genů regulujících spermatogenezi.

Dlouhodobé soužití patogenů s jejich eukaryotními hostiteli a jejich koevoluce poskytly patogenům schopnost využívat funkce hostitelské buňky pro své přežití, replikaci a uniknutí imunitnímu systému (Angrisano et al. 2010). Patogeny mohou manipulovat s epigenetickými procesy a ovlivňovat tak reakce hostitelské buňky spojené s imunitní a zánětlivou reakcí a přispět tak k vývoji chronické formy onemocnění (Paschos and Allday 2010).

Je dobře zdokumentováno, že dsDNA genomy virů a genomy retrovirů jsou v infikovaných buňkách regulovány epigenetickými mechanismy (DNA metylace, modifikace histonů). Proteiny těchto epigenetických regulačních mechanismů kódované virovými genomy mohou mít vliv i na promotory genů hostitelské buňky. To může vést k epigenetické změně regulace a následné buněčné dysfunkci, která může přispět k rozvoji patologických změn (např. zahájení a průběh zhoubných novotvarů, imunodeficience). Bakterie infikující savce mohou vyvolat onemocnění podobným způsobem- tím, že způsobí hypermetylaci klíčových buněčných promotorů, např. *Campylobacter rectus* v placentě nebo *Helicobacter pylori* v žaludeční sliznici. A zřejmě kromě virů a bakterií mohou i jiní mikroparazité (prvoci), stejně jako makroparazité (helminti, členovci, houby) a faktory životního prostředí vyvolat patologické změny v epigenetickém programu infikovaných hostitelských buněk. Objasnění důsledků infekce na epigenetický program hostitele (nově se rozvíjející obor patho-epigenetika) může mít významný léčebný přínos, protože epigenetické procesy jsou vratné a odstranění patho-epigenetických změn navozených mikrobem může zabránit rozvoji nemoci (Minárovits 2009).

1.4.1. DNA metylace

DNA metylace je kovalentní modifikace cytosinových zbytků spojená s modulací genové exprese. Ve většině eukaryotické DNA se 60% až 90% metylcytosinových zbytků objevuje v CpG dinukleotidových sekvencích (Cisneros 2004), které se skládají z cytosinu vázaného na guanin pomocí fosfodiesterové vazby, přičemž CpG dinukleotidy lze nalézt ve skupinách, které se nazývají CpG ostrůvky. Hypermetylace DNA v CpG ostrůvcích promotoru genu je spojená s inhibicí genové exprese, zatímco hypometylace souvisí s aktivací exprese genů (Rajender and Agarwal 2011).

Během zrání zárodečných buněk a gametogeneze, procházejí buňky zárodečné linie rozsáhlým epigenetickým přeprogramováním. Tento proces zahrnuje vymazání somatického metylačního vzoru a následuje nastavení sex-specifického vzoru de novo metylací DNA (Rousseaux et al. 2005). V samčí zárodečné linii začíná metylace ještě před narozením v prospermatogoniích a je dokončena po narození v průběhu spermatogeneze a maturace spermií (Kafri et al. 1992; Ariel et al. 1994; Davis et al. 2000; Ueda et al. 2000; Lees-Murdock et al. 2003; Oakes et al. 2007). Neúplné přeprogramování buněk zárodečné linie může vést ke změně v metylaci DNA spermií a snížené spermatogenezi (Houshdaran et al. 2007).

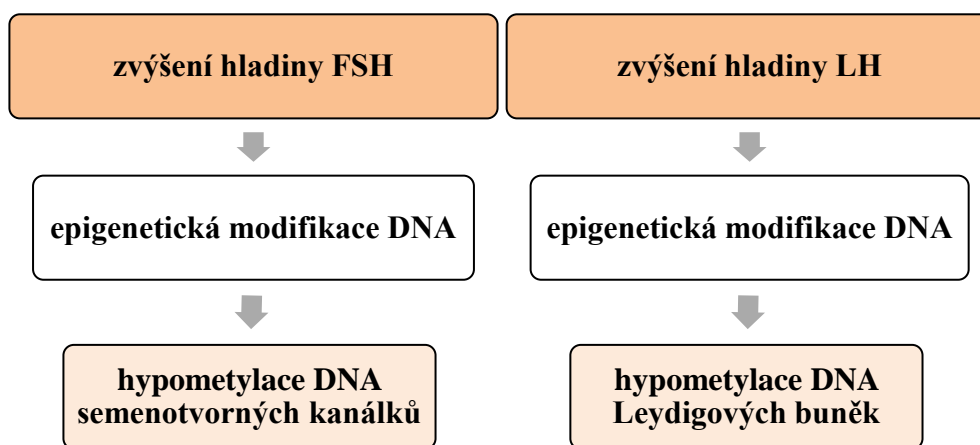
DNA metylace mění genovou expresi aniž by ovlivňovala sekvenci DNA, probíhá po replikaci DNA a zahrnuje přenos metylové skupiny z S-metyl-adenosyl metyoninu na 5' pozici cytosinového zbytku v reakci katalyzované enzymem DNA metyltransferázou (DNMT) (Cisneros 2004), přičemž deficiencie některých DNMTs v buňkách germinální linie jsou u myši spojeny s určitou mírou sterility. DNMT3L deficiencie způsobuje meiotické vady, stejně jako snížení metylace imprintovaných genů. V DNMT3L deficientních jedincích vypadají semenotvorné kanálky do čtvrtého týdne postnatálního vývoje histologicky normálně, ovšem poté obsahují pouze málo zbývajících spermatocytů (Bourc'his and Bestor 2004; Webster et al. 2005).

Při použití látek inhibujících DNA metylaci, které se sice začleňují do DNA během replikace, ale vzhledem k přítomnosti dusíku na pozici C5 nejsou schopny přijmout metylovou skupinu, dochází k přetrvávající kovalentní vazbě DNMT a metylace DNA je tak inhibována, což nepřímo vede k hypometylaci a rychlé ztrátě DNMT činnosti (Creusot et al. 1982; Christman et al. 1983; Gabbara and Bhagwat 1995). Studie, které zkoumaly vliv inhibitorů DNA metylace na reprodukční schopnosti samců, přinesly důkazy o spojení mezi abnormální metylací DNA a snížením fertility. Působení těchto inhibitorů vede u samců myši a potkanů ke snížené produkci spermií a váhy testes a ke změně v testikulární histologii (Doerksen and Trasler 1996; Doerksen et al. 2000; Kelly et al. 2003). Epigenetické změny tedy ovlivňují spermatogenezi a aberantní epigenetické modifikace v určitých lokusech, stejně jako demethylace některých imprintovaných gen, jsou spojeny se samčí neplodností.

U mužů byla změna metylace DNA spermií pozorována u jedinců s oligospermií (Kobayashi et al. 2007; Marques et al. 2008) a tudíž, abnormální DNA metylace germinálních buněk je jedním z možných mechanismů narušující spermatogenezi některých mužů s idiopatickou neplodností (Wu et al. 2010). Studie zkoumající specifické geny exprimované během spermatogeneze ukázaly, že nastavení vzoru metylace DNA v genomu spermií může

představovat rozhodující aspekt zrání spermií, přičemž k této DNA metylaci dochází v průběhu spermatogeneze, ale i při edidymálním tranzitu. Vzhledem k tomu, že blokace DNA metylace buněk germinální linie vede ke snížení množství kondenzovaných spermatid a spermií ve varlatech, může měření úrovně metylace DNA v lidských spermiích představovat nový přístup zjišťování schopnosti spermií oplodnit oocyt při asistované reprodukci (Benchai et al. 2003; Flanagan et al. 2006).

DNA metylace je ve varlatech během vývoje různě regulována a je také kontrolována gonadotropními hormony. Hypometylace DNA semenotvorných kanálků a Leydigových buněk lze dosáhnout podáním FSH, respektive LH (Reddy and Reddy 1990) (Obr. 9), navíc exprese receptoru FSH hormonu je regulována právě metylací jeho promotoru. U hlodavců jsou CpG dinukleotidy v promotoru FSH receptorů metylovány v non-exprimujících buňkách a tkáních, v Sertoliho buňkách naopak metylovány nejsou (Heckert and Griswold 2002). Tato skutečnost nabízí jedno z možných vysvětlení, jakým způsobem *Toxoplasma gondii* může ovlivňovat úroveň metylace DNA testikulárních buněk a to tedy skrze koncentraci gonadotropinů.



Obr. 9 Schéma efektu gonadotropiních hormonů na úroveň metylace DNA testikulární tkáně

Snížení koncentrace spermií, které bylo pozorováno v důsledku aberantní metylace DNA, bylo pozorováno i u samců potkanů, myší a lidí po infekci parazitem *Toxoplasma gondii* (Zhou et al. 2003; Yang et al. 2006; Terpsidis et al. 2009), což naznačuje, že infekce může způsobovat defekty reprodukčních parametrů právě tímto mechanismem, tedy ovlivněním epigenetické modifikace DNA. Navíc bylo dokumentováno, že při abnormální

metylaci vybraných genů primárního screeningu dochází právě k některým defektům spermatogeneze, které byly pozorovány u infikovaných jedinců (více v následující kapitole).

1.4.2. Spermatogeneze a genová exprese

Expresí genů regulujících spermatogenezi je vývojově regulována a je specifická pro jednotlivé fáze spermatogeneze. Každá z fází procesu spermatogeneze závisí na expresi skupiny genů, přičemž některé z transkriptů, které během spermatogeneze vznikají, jsou produktem genů, které jsou samčími zárodečnými homology genů somatických buněk, zatímco jiné transkripty jsou produktem specifických genů germinálních buněk. Ostatní transkripty jsou alternativními přepisy stejného genu jako v somatických buňkách, ale od somatických transkriptů se liší velikostí a jsou výsledkem použití jednoho nebo více alternativních transkripčních startů, sestřihových míst, exonů nebo polyadenylačních signálů (Eddy 2002; Bettegowda and Wilkinson 2010).

V mé práci jsem se v primárním screeningu metylace DNA zaměřila na 3 geny regulující spermatogenezi, u kterých je známo, že jejich aktivita je regulována gonadotropními hormony a že jejich promotory obsahují CpG dinukleotidy: gen *Hspa1*, *Crem* a *Creb1*.

1.4.2.1. *Hspa1*

Hspa1 gen kóduje testes specifický heat shock cognate protein HSC70t, který je členem HSP70 rodiny proteinů. Expresí proteinů tepelného šoku (hsps) je vysoce regulovanou událostí v průběhu celého procesu spermatogeneze. Stejně jako ve většině typů buněk, i v buňkách varlat, jsou hsps rychle syntetizovány v reakci na stresory okolního prostředí, jako je např. zvýšení teploty. Tepelně indukované hsps hrají důležitou cytoprotektivní roli v prevenci proti nevratnému poškození buněčných proteinů vazbou na nesbalené proteiny a tím tak zpomalují tepelnou denaturaci těchto proteinů. Kromě role v ochraně proteinů vůči teplu se hsps také podílí na mnoha normálních buněčných procesech. Mezi ně patří skládání a sbalení vznikajících polypeptidů, oligomerizace a intracelulární transport proteinů. Ve varlatech jsou tedy některé hsps konstitutivně exprimovány v reakci na normální buněčné funkce, jako je růst, vývoj a postup buněčným cyklem, zatímco jiné jsou exprimovány za stresových podmínek, jako je vystavení zvýšené teplotě. Hsp proteiny jsou exprimovány ve spermatogenních buňkách s cílem zajistit jejich specializované potřeby (Sarge and Cullen 1997).

HSC70t je exprimován v germinálních buňkách postmeiotické fáze spermatogeneze. Tento protein je přítomný v cytoplasmě elongovaných spermatid, v dřívějších stádiích nikoliv. Myši s homozygotní mutací v tomto genu jsou fertilní a histologické studie ukázaly, že vývoj

buněk germinální linie v postmeiotické fázi není narušen, nicméně spermie těchto jedinců se za *in vitro* podmínek staly imotilními během jedné hodiny, zatímco spermie kontrolních jedinců zůstaly motilní po dobu několika hodin. Hladina ATP u spermií HSC70t^{-/-} jedinců je nízká a zdá se, že produkce ATP u těchto spermií je narušená. HSC70t je tedy chaperonem, který je nezbytný pro správnou funkci proteinů syntézy energie v postmeiotických germinálních buňkách (Tsunekawa et al. 1998; Eddy 2002; Asano et al. 2009).

Deficience proteinu HSC70t je spojena se sníženou motilitou spermií, což je jeden z defektů reprodukčních parametrů, které byly pozorovány při infekci samců parazitem *Toxoplasma gondii* (Zhou et al. 2003; Terpsidis et al. 2009) a může tak naznačovat spojitost mezi infekcí a mechanismem, kterým *T. gondii* defekt způsobuje. Navíc *Hspa1* promotor genu obsahuje CpG dinukleotidy, takže exprese tohoto genu může být regulována právě DNA metylací a podle doposud nepublikovaných výsledků z *in vivo* studie (Dostálová et al.), ve které byl zkoumán vliv bisfenolu A na reprodukční parametry myši, byla prokázána zvýšená metylace specifických CpG dinukleotidů genu *Hspa1* oproti kontrolám.

1.4.2.2. *Crem a Creb*

Transkripční faktory CREM a CREB jsou strukturními homology, kteří mají na karboxy-terminálním konci DNA-vazebnou bZIP doménu obsahující pozitivně nabitý DNA-vazající region (b) a dimerizační region obsahující leucinový zip (ZIP), kteří skrze signální cAMP dráhu ovlivňují expresi genů a mohou působit jako aktivátory či represory. Po stimulaci buňky a přenosu signálu přes protein kinázu A (PKA) dochází k fosforylaci a dimerizaci CREM a CREB proteinů a vazbě na cAMP-responzivní elementy (CRE) promotoru regulovaných genů a tím k ovlivnění jejich transkripce (Hoeffler et al. 1988; Roesler et al. 1988; Foulkes et al. 1991; Gonzalez et al. 1991; Meyer and Habener 1992; de Groot et al. 1993; Walker et al. 1994). V testikulární tkáni (v germinálních a Sertoliho buňkách) dochází k alternativnímu sestřihu transkriptů CREM a CREB genů a k cyklickému střídání aktivátorových a represorových sestřihových forem během 12-denního cyklu spermatogeneze. Vzhledem k přítomnosti CRE v promotoru *Crem* a *Creb* genů dochází k autoregulaci jejich exprese cAMP signální drahou v opačném směru (Waeber et al. 1991; Ruppert et al. 1992; Waeber and Habener 1992; Delmas et al. 1993; Meyer et al. 1993)

Vzhledem k tomu, že exprese a aktivita těchto proteinů je regulována gonadotropními hormony, pro které germinální buňky postrádají receptory, využívají těsného spojení se Sertoliho buňkami, které předávají signály těchto hormonů germinálním buňkám pomocí parakrinních faktorů a řídí tak proces spermatogeneze. K odpovědi na vnější signály využívají

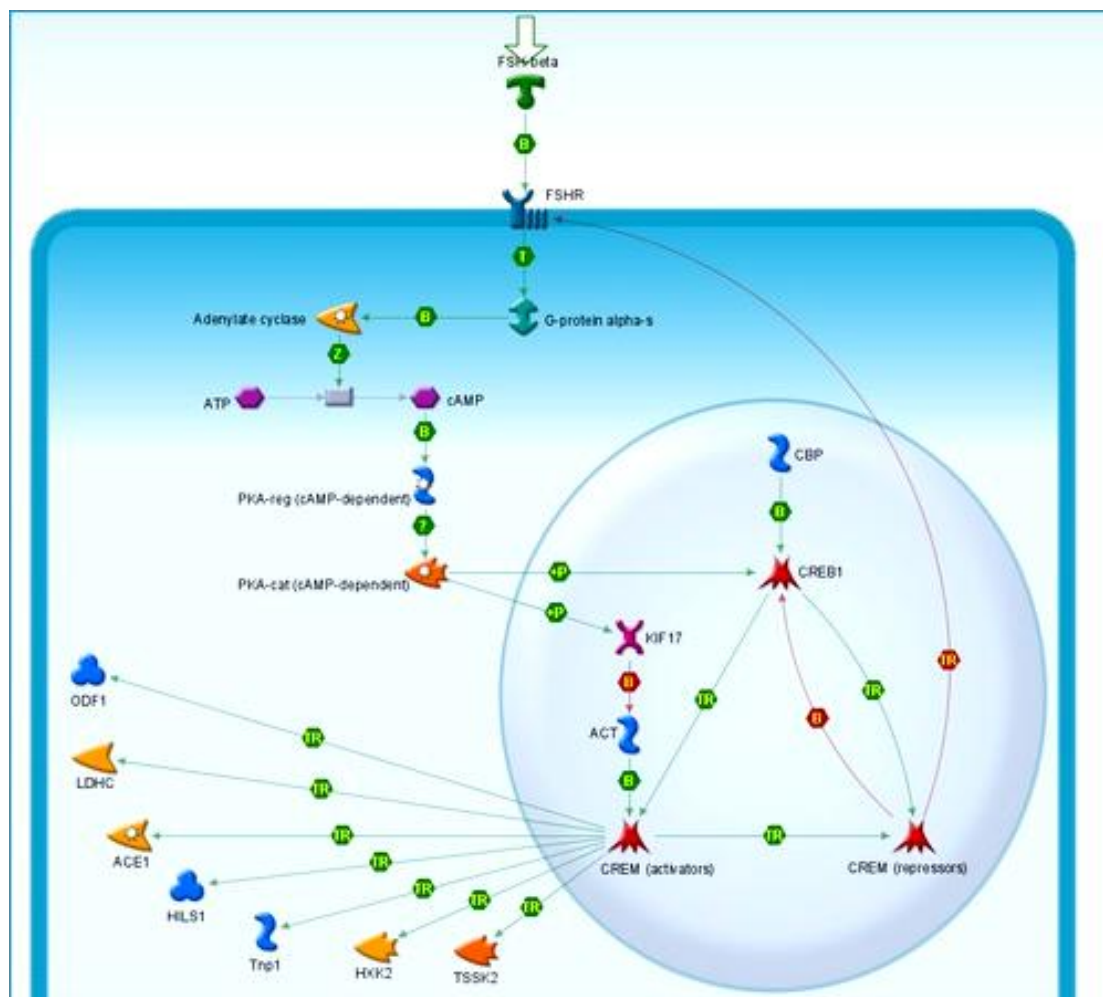
germinální buňky celou řadu signálních drah, které společně tvoří síť regulující spermatogenezi (Weinbauer and Wessels 1999).

1.4.2.2.1. *Crem*

Crem gen kóduje modulátor cAMP responzivních elementů (cAMP responsive element modulator), který je považován za klíčový regulátor spermatogeneze (Blendy et al. 1996; Nantel et al. 1996; Weinbauer et al. 1998). Transkripční faktor CREM se váže na cAMP responzivní elementy (CRE) a moduluje tak transkripci cAMP responzivních genů, mezi které patří i několik spermatid specifických genů (Sassone-Corsi 1995). Inaktivace *Crem* genu u myši vyvolala blokaci spermatogeneze ve stádiu kulatých spermatid, což vede k arestu maturace spermatid, apoptóze spermatocytů a k neplodnosti, aniž by byla narušena hormonální regulace spermatogeneze. Neplodnost u těchto myši je způsobena nedostatečnou expresí klíčových genů potřebných k postmeiotické diferenciaci, jako jsou například geny pro protamin 1 a 2 a proakrozín. U mužů neplodných z důvodu maturačního arestu spermatid bylo zaznamenáno významné snížení nebo kompletní nedostatek na úrovni CREM proteinu i mRNA (Blendy et al. 1996; Sassone-Corsi 1998; Weinbauer et al. 1998; Steger 1999). Analýza exprese testikulárního CREM u hlodavců, opic a lidí přinesla velmi srovnatelné výsledky naznačující obecný význam CREM proteinu pro maturaci spermatid v savčích varlatech (Behr and Weinbauer 2001).

CREM protein je exprimován jak v germinálních buňkách, tak v somatických Sertoliho buňkách (Wistuba et al. 2007), nicméně aktivace CREM proteinu se mezi buněčnými typy liší. V somatických Sertoliho buňkách je CREM aktivován fosforylací kinázami, které jsou stimulovány hormony, růstovými faktory, intracelulárním Ca^{2+} a stresovými faktory (De Cesare et al. 1999), ovšem v germinálních buňkách CREM pro svou aktivaci nevyžaduje fosforylace ani asociaci s koaktivátory. V postmeiotických buňkách germinální linie je CREM aktivován na základě interakce se svým aktivátorem, ACT proteinem (activator of CREM in the testis) (Fimia et al. 1999; Fimia et al. 2000; Palermo et al. 2001).

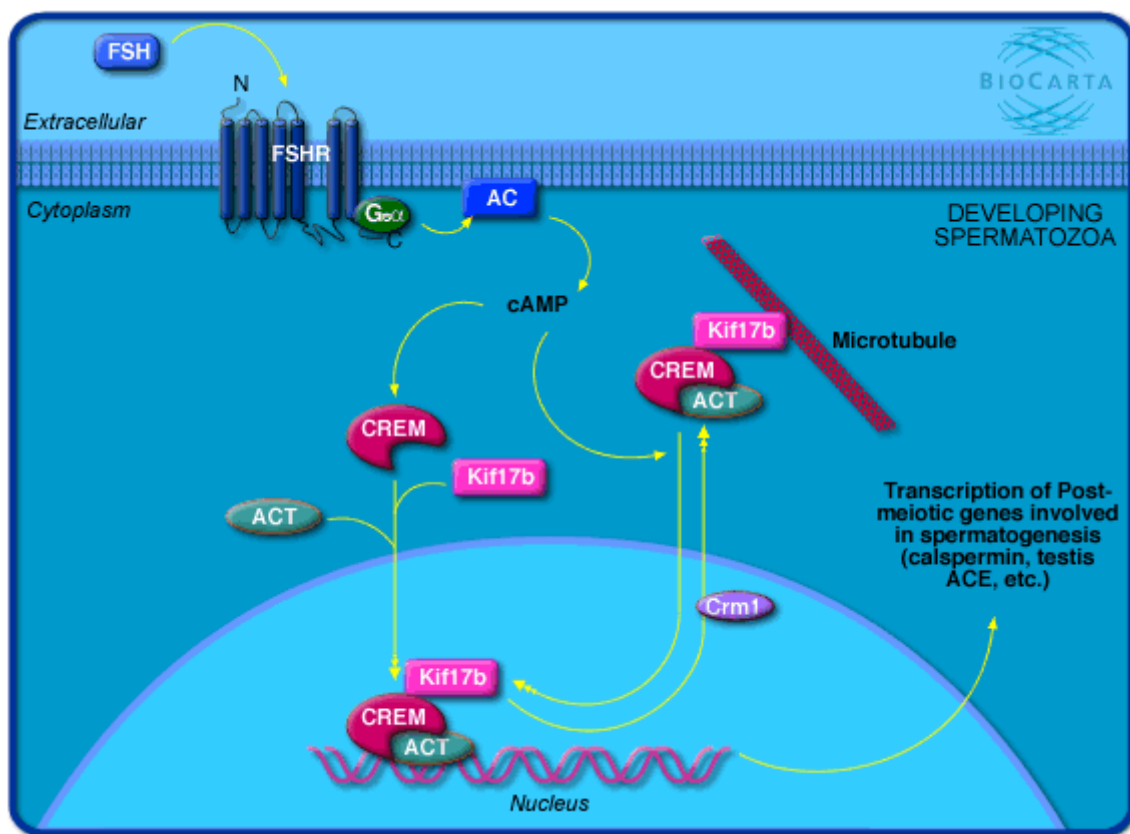
Na Obr.10 je zobrazena signální kaskáda FSH hormonu, který aktivuje CREM v somatických Sertoliho buňkách. Vazbou na svůj s G-proteinem spřažený receptor aktivuje adenylát cyklázu, která zvyšuje hladinu cAMP a následně aktivuje PKA, která vede k fosforylaci CREM na serinu 117 v jádře buňky, což umožňuje jeho interakci s koaktivátory. Ty pak umožňují spojení CREM s transkripční mašinerií srkze interakci s proteinem preiniciačního komplexu TFIIB (Foulkes et al. 1993; Sassone-Corsi 1995). (Obr.10)



Obr. 10 Mechanismus aktivace CREM proteinu v somatických a germinálních buňkách (http://www.genego.com/map_1580.php)

V buňkách germinální linie je regulace aktivity CREM pomocí ACT řízena specifickým kinezímem KIF17b, který mění subcelulární lokalizaci ACT. ACT je specificky exprimován v haploidních kulatých a elongovaných spermatidách, přičemž vrcholu exprese dosahuje u kulatých spermatid. Expresní profil ACT se plně překrývá s expresí CREM proteinu. V určitých fázích zrání spermatid dochází ke specifické asociaci ACT s KIF17b, který zprostředkovává transport ACT z jádra do cytoplazmy a tím tak reguluje CREM-zprostředkovanou transkripci genů. Ve stádiu kulatých spermatid je ACT přítomno v jádře, ovšem ve stádiu elongovaných spermatid je přítomno v cytoplazmě a stejně tomu je i u KIF17b, což naznačuje mechanismus regulace genové exprese CREM-dependentních genů. KIF17b zprostředkovaná relokace ACT do cytoplazmy časově koreluje s ukončením exprese CREM-dependentních genů. Studie myši s delecí genu pro ACT protein potvrdila, že tento aktivátor je nezbytný pro správný vývoj hlavičky a bičíku spermie (Fimia et al. 1999; Macho

et al. 2002; Kotaja et al. 2004; Kotaja et al. 2005). Zajímavé je, že pohyb KIF17b mezi jádrem a cytoplazmou a jeho schopnost relokalizovat ACT jsou nezávislé na mikrotubulech a na ATP-závislé motorové funkci kinesinu. Naopak bylo prokázáno, že pohyb KIF17b je modulován fosforylací pomocí PAK. Tyto poznatky poukazují na novou, na mikrotubulech nezávislou funkci kinesinu, která je řízená cAMP a PKA a tedy propojení PKA signalizace a regulace exprese CREM-dependentních genů v postmeiotických germinálních buňkách bez přímé fosforylace CREM proteinu. Ačkoliv nebyla v germinálních buňkách potvrzena přítomnost FSH receptoru aktivující adenylát cyklázu, aktivita PKA se v průběhu diferenciaci germinálních buněk mění, přičemž vrcholu dosahuje ve stádiu spermatid. Její aktivita je v germinálních buňkách regulována skrze neustálou komunikaci mezi germinálními a Sertoliho buňkami, které regulují funkce buněk germinálních pomocí parakrinních signálních molekul (Lönnerberg et al. 1992; Griswold 1998; Kotaja et al. 2005) (Obr. 11).



Obr 11. Schéma aktivace CREM proteinu buňkách germinální linie
(http://www.biocarta.com/pathfiles/h_crempathway.asp#)

Exprese *Crem* genu je pod kontrolou čtyř promotorů, P1-P4. Aktivací P1 promotoru vzniká mRNA kódující aktivátorové a represorové izoformy CREM proteinu (Molina et al. 1993; Stehle et al. 1993). Syntéza CREM aktivátorů během spermatogeneze je pod kontrolou HPA osy, kde působení FSH hormonu řídí přepnutí mezi expresí represorů a aktivátorů pomocí alternativní polyadenylace, která vede ke zvýšení stability transkriptu (Foulkes et al. 1993). Aktivací P2 promotoru, který leží blízko 3'konce genu, vzniká cAMP časný represor ICER, který negativně reguluje expresi CRE-genů, včetně genu kódujícího FSH receptor a potlačuje také aktivitu vlastního promotoru, takže funguje jako negativní regulátor (Molina et al. 1993; Stehle et al. 1993; Monaco et al. 1995). Aktivací P3 a P4 promotorů vznikají v testikulární tkáni další dvě aktivátorové formy CREM. K aktivaci P1, P3 a P4 promotorů dochází v testikulární tkáni v různých časových fázích spermatogeneze (Daniel et al. 2000).

Kromě gonadotropinu FSH reguluje expresi *Crem* genu také metylace jeho promotoru. Nanassy and Carrell (2011) provedli studii u mužů s oligozoospermií, tedy se sníženou koncentrací spermií v ejakulátu a dokumentovali významně vyšší metylaci *Crem* genu ve srovnání s kontrolními jedinci. Zvýšená metylace byla spojena se snížením kvality spermatu, konkrétně s koncentrací spermií, jejich pohyblivostí a normální morfologií hlavičky, což demonstruje významnou roli CREM během spermatogeneze a asociaci abnormálně zvýšené methylace *Crem* genu se sníženou samčí plodností. Zvýšená metylace promotoru *Crem* genu byla také zaznamenána u mužů neplodných z důvodů abnormální protaminace spermií, což naznačuje, že narušení exprese *Crem* kvůli změnám v metylaci může vést k abnormálnímu poměru protaminů a k defektnímu sbalení chromatinu ve spermiích. Abnormální protaminace DNA spermií je spojena se snížením jejich počtu a pohyblivosti a zvýšeným výskytem abnormalit jejich morfologie. Navíc je u těchto spermií pozorována zvýšená fragmentace DNA a snížení penetrační a fertilizační schopnosti (Aoki et al. 2005 ; Aoki et al. 2005).

Defekt v reprodukčních parametrech způsobené zvýšenou metylací *Crem* genu jsou ve shodě s defekty, které byly pozorovány u samců infikovaných parazitem *Toxoplasma gondii* (Zhou et al. 2003; Yang et al. 2006; Terpsidis et al. 2009).

1.4.2.3. Creb1

Protein CREB hraje důležitou roli v buněčné proliferaci a diferenciaci v průběhu procesu spermatogeneze (Kim et al. 2009). Fosforylovaný a tedy aktivovaný CREB v Sertoliho buňkách je esenciálním faktorem pro podporu spermatogeneze. Pokud není CREB v Sertoliho buňkách fosforylovaný, dochází k apoptóze germinálních buněk ve stádiu spermatocytů a spermie nejsou produkovány (Scobey et al. 2001). Z důvodů bariéry mezi krví a semenotvornými kanálky musí Sertoliho buňky zajišťovat mnoho faktorů nezbytných pro

přežití a pro udržení správného metabolismu, růstu a diferenciaci germinálních buněk (Huleihel and Lunenfeld 2004) a exprese některých těchto faktorů je regulována právě pomocí cAMP (Mita et al. 1982; Rossi et al. 1993; Suire et al. 1995), příkladem může být SCF (stem cell factor). Pokud nedochází k SCF stimulaci, podstupují spermatogonie a spermatocyty apoptózu (Packer et al. 1995; Guerif et al. 2002).

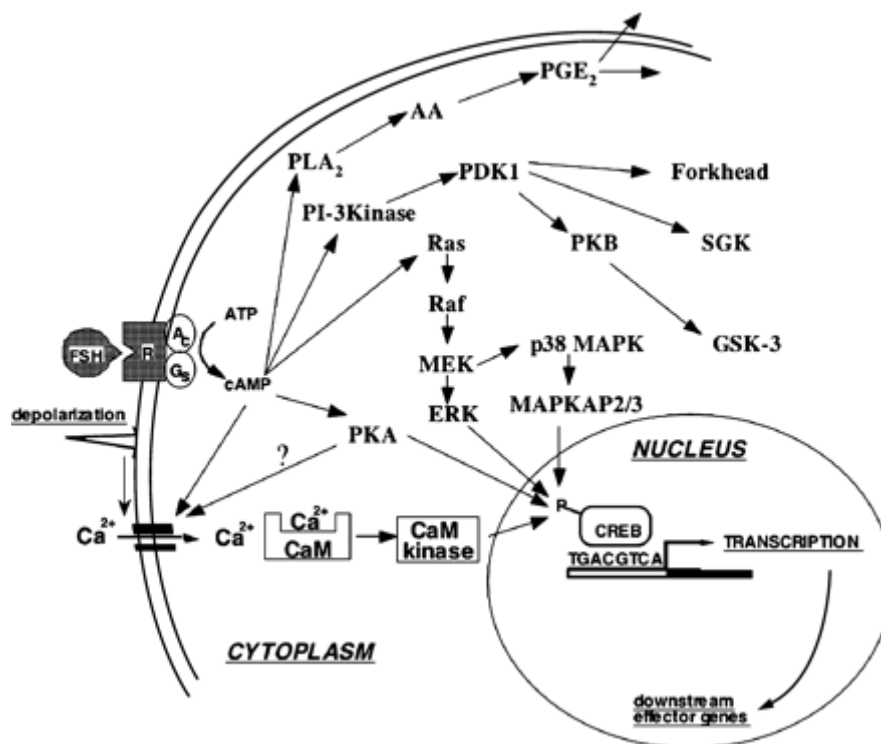
Extracelulární hormonální signál vede k indukci exprese a/nebo k fosforylaci CREB, která vede k pozitivnímu či negativnímu ovlivnění transkripce cAMP-dependentních genů (Tan et al. 1996; Iordanov et al. 1997; Montminy 1997) v závislosti na specifických isoformách CREB proteinu, které vznikají alternativním sestřihem transkriptů *Creb1* genu (Girardet et al. 1996; Walker and Habener 1996). Tyto specifické isoformy CREB proteinu jsou vysoce exprimovány ve varlatech dospělých jedinců po zahájení procesu spermatogeneze (Ruppert et al. 1992). Fosforylací aktivovaná aktivátorová isoforma CREB se váže na CRE-element v promotoru regulovaných genů, interaguje s CREB koaktivátorem a tak usnadňuje nasednutí RNA-polymerázy a tím tak umožňuje transkripci daného genu (Kwok et al. 1994). Naopak inhibitory, označované I-CREBs, down regulují expresi cAMP-regulovaných genů tím, že se váží do CRE oblasti genů a tak znemožňují vazbu CREB aktivátorů. Expresi I-CREBs v germinálních buňkách je navíc vývojově specifická a koreluje s cyklickou down regulací CREB aktivátorů, což naznačuje, že I-CREBs reprimují expresi cAMP-inducibilního *Creb1* genu stejně jako expresi dalších genů přechodně indukovaných cAMP během 12-denního cyklu spermatogeneze (Walker and Habener 1996).

Scobey et al. (2001) ve své studii objasnili funkci CREB proteinu v procesu spermatogeneze tím, že CREB protein inhibovali pomocí nereplikujícího se vektoru adenoviru, který vede k produkci mutantní CREB formy neschopné fosforylace na serinu 133 (AdCREBm1) a tedy i aktivace a to bez zjevného cytotoxického efektu (Somers et al. 1999). Ve svém pokusu infikovali semenotvorné kanálky AdCREBm1 *in vivo*, což nevedlo k ovlivnění životaschopnosti Sertoliho buněk, ale ke zvýšené apoptóze spermatocytů a tak k eliminaci pozdějších stádií germinálních buněk. Fakt, že apoptóza germinálních buněk nebyla výsledkem nespecifické odpovědi na adenovirus, byla ověřena injekcí Ad β -gal, která k poklesu počtu germinálních buněk nevedla. 14 dní po injekci adenoviru došlo k nárůstu počtu semenotvorných kanálků s narušenou spermatogenezí zahrnující nepřítomnost kulatých spermatid, což na základě známého časového průběhu spermatogeneze potkanů vede ke konstatování, že právě pachytenní spermatocyty jsou buněčným stádiem germinálních buněk, které jsou nepříznivě ovlivněny infekcí AdCREBm1 (Scobey et al. 2001). Také u CREB314-deficientních myší (CREB314 patří do CREB rodiny transkripčních faktorů) dochází ke

zvýšené apoptóze meiotických a post-meiotických germinálních buněk, ačkoliv celková plodnost jedince nebyla narušená (Adham et al. 2005).

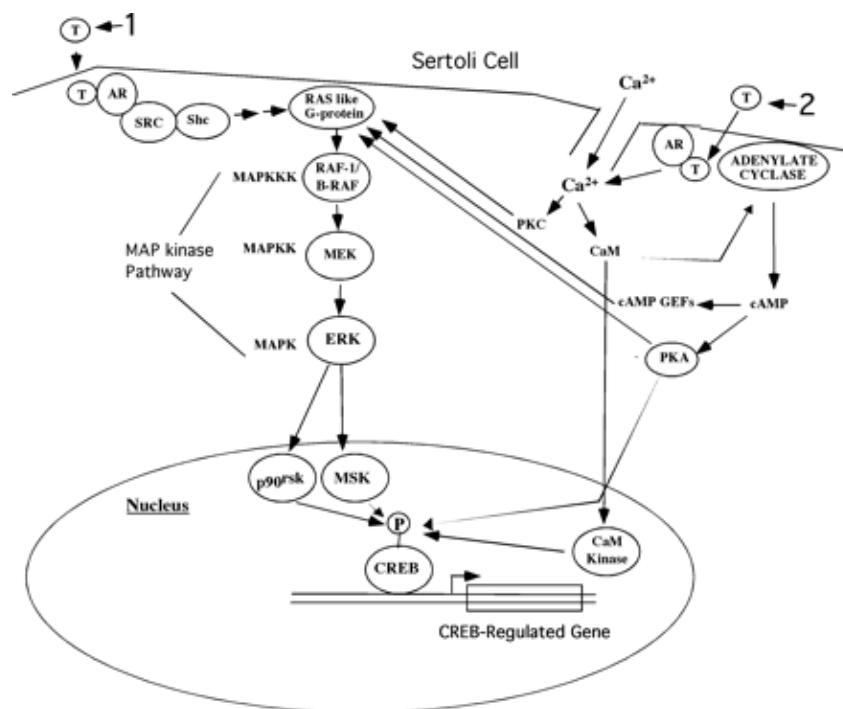
Mechanismus účinku proteinu CREB závisí na stimulaci buňky. V somatických Sertoliho buňkách je CREB aktivován fosforylací kinázami, které jsou stimulovány hormony, růstovými faktory, intracelulárním Ca^{2+} a stresovými faktory (De Cesare et al. 1999). Signální molekula jako je např. FSH a LH, vazbou na svůj receptor na Sertoliho buňkách vede k aktivaci několika signálních drah, mezi které patří cAMP-PKA dráha, MAP kinázová dráha a dráha vápenatých kationtů, které vedou k fosforylaci CREB (Obr.12). Fosforylovaný CREB váže koaktivátor CBP (CREB- binding protein) a společně s basálními transkripčními faktory umožňují nasednutí RNA-polymerázy a zahájení transkripce (Chrivia et al. 1993; Kwok et al. 1994).

cAMP-PAK dráha vede přes G-protein aktivující adenylát cyklázu (AC), která zvyšuje hladinu intracelulárního cAMP, který následně aktivuje PKA fosforylující CREB na serinu 133, čímž dochází k jeho aktivaci (Walker et al. 1995). MAP kinázová dráha a ERK kinázy jsou pomocí FSH aktivovány skrze interakci cAMP s GEFs (guanine nucleotide exchange factors) a aktivací Ras G-proteinu zejména v pubertálním období a vedou k ovlivnění proliferace Sertoliho buněk (Crépieux et al. 2001). FSH způsobuje také vstup Ca^{2+} iontů do Sertoliho buněk a to modifikací Ca^{2+} iontových kanálů v plazmatické membráně (PM) pomocí cAMP a možná také PKA (Gorczyńska et al. 1994). Ca^{2+} inoty aktivují kalmodulin a CaM kinázu, která translokuje do jádra a fosforyluje CREB (Wu et al. 2001).



Obr. 12 FSH signální dráha aktivující CREB transkripční faktor (Walker and Cheng 2005).

CREB protein může být také aktivován testosteronem. Fix et al. (2004) ve své studii poukázal na fakt, že testosteron může v Sertoliho buňkách kromě své klasické dráhy působení přes androgenní receptor (AR), který následně interaguje s DNA a mění tak genovou expresi, působit také přes alternativní rychlou dráhou bez nutnosti interakce AR se specifickým úsekem DNA. Dvě možné potencionální dráhy, kterými testosteron indukuje aktivaci CREB jsou zobrazeny na Obr. 13 a popsány v textu výše. Přítomnost AR v těsné blízkosti PM, kterou tyto dráhy vyžadují, prokázali Cheng et al. (2007) ve své mikroskopické studii, kde navíc také pozorovali migraci AR k PM po stimulaci buňky testosteronem.



Obr. 13 Potencionální signalizační dráhy aktivované testosteronem, které vedou k fosforylaci CREB v Sertoliho buňkách (Walker and Cheng 2005).

2. Cíle diplomové práce

V mé diplomové práci jsem se zabývala vlivem infekce parazitem *Toxoplasma gondii* na reprodukční parametry myších samců kmene C57BL/6.

V první části jsem se zaměřila na histometrickou analýzu testikulární tkáně experimentálních jedinců. Hodnotila jsem parametry semenotvorných kanálků varlat, které odráží kvantitu i kvalitu produkce spermií a tedy celkovou reprodukční fitness samce.

V druhé části jsem se zaměřila na studium dvou možných cest, kterými *T. gondii* může reprodukční parametry ovlivňovat. První je ovlivnění koncentrace gonadotropních hormonů a narušení hormonální regulace spermatogeneze. Druhou je změna epigenetické modifikace DNA a tím exprese genů ovlivňujících spermatogenezi.

1. Detekce histologických změn v semenotvorných kanálcích testikulární tkáně

- příprava kryořezů testikulární tkáně experimentálních jedinců
- histometrická analýza reprodukčních parametrů spermatogeneze

2. Detekce hladiny gonadotropního hormonu LH

- měření hladiny LH hormonu v moči experimentálních jedinců

3. Detekce míry epigenetické modifikace DNA v testikulární tkáni

- analýza globální metylace DNA testikulární tkáně
- analýza specifické DNA metylace genů regulujících spermatogenezi

3. Experimentální část

3.1. Přístrojové vybavení a použité materiály

3.1.1. Přístrojové vybavení

Thermomixer comfort	Eppendorf
Centrifuga MiniSpin plus	Eppendorf
Třepačka Grant-bio PB1	P-LAB
CO ₂ inkubátor NB-203LC	IR N-Boitek
Světelný mikroskop BX51	Olympus
Mrazák -80°C Platinum 340	Angelantoni As biomedical division
Mrazák -20°C	Gorenje
LH analyzátor AIA-360	Tosoh
Spektrofotometr ND-1000	NanoDrop
Flow Box BioIIA	Telstar
Váha WPS360/C/2	Radwag
pH metr PHB-212	Omega
Zařízení pro úpravu vod	AQUA Destilata Demiwa 5rosa
	SCI-AQUA lab
Kryostat CM3050S	Leica
Vyhřívaná destička	Thermo-meter
Pyrosekvenátor	PyroMark Q24
Spektrofotometr	OpsysMR (Dynex Technologies, Chantilly, VA)

3.1.2. Použité chemikálie

Aceton	Lach-Ner
Ethyl-alkohol 100%, 96%	Lach-Ner
Sacharóza	Lach-Ner

Hematoxylin Harrisův CSC	Vakos a.s
Eosin	Lachema
Xylen	Lach-Ner
Kanadský balzám	Intraco-micro
Tissue-Tek	Jung

3.1.3. Roztoky

30% roztok sacharózy:

3g sacharózy

10ml PBS (1x koncentrovaný)

PBS (10x koncentrovaný):

1l destilované H₂O

8g NaCl

0,2g KCl

2,685g Na₂HPO₄ (pro 12 H₂O)

0,2g KH₂PO₄

PBS (1 x koncentrovaný):

10 ml PBS- 10 x koncentrovaného

90 ml destilované H₂O

Okyslený alkohol:

80% alkohol 100ml

3 kapky HCl

Voda s NaHCO₃

Destilovaná voda 100ml

3.1.4. Pokusná zvířata

Pokusná zvířata byla zakoupena od společnosti *Anlab* ve věku 60-ti dní. Po dobu trvání experimentu byla chována v bariérových chovech Státního zdravotního ústavu (SZÚ Praha). V pokusech byly použity dvě skupiny myši inbredního laboratorního kmene C57Bl/6. První skupina obsahovala infikované jedince parazitem *Toxoplasma gondii*, druhá skupina obsahovala kontrolní jedince. V každé skupině bylo 9 myších samců, kteří byli umístěni po třech jedincích do jedné chovné nádoby. Po celou dobu experimentu měla zvířata volný přístup k vodě a potravě, 12-ti hodinový denní cyklus a byla umístěna v jedné místnosti se stálou pokojovou teplotou (19-21°C). Po uplynutí doby experimentu 30-ti dnů byla zvířata zabita ve stáří 100 dní cervikální dislokací a byly jim odebrány orgány pro studium. Varlata byla zmrazena v tekutém dusíku a uchována v -80°C do doby použití, moč byla uchována v -20°C do doby použití. Krevní sérum bylo skladováno v -20°C. Varlata byla použita pro přípravu kryosekci na histologickou analýzu a pro izolaci DNA, která byla následně použita pro studium metylace DNA. V moči byla měřena hladina gonadotropního hormonu LH a sérum bylo podrobeno testování úspěšnosti infekce KFR testem.

Během experimentu došlo k úhynu jednoho infikované jedince, tento jedinec byl z experimentu a statistických analýz vyřazen.

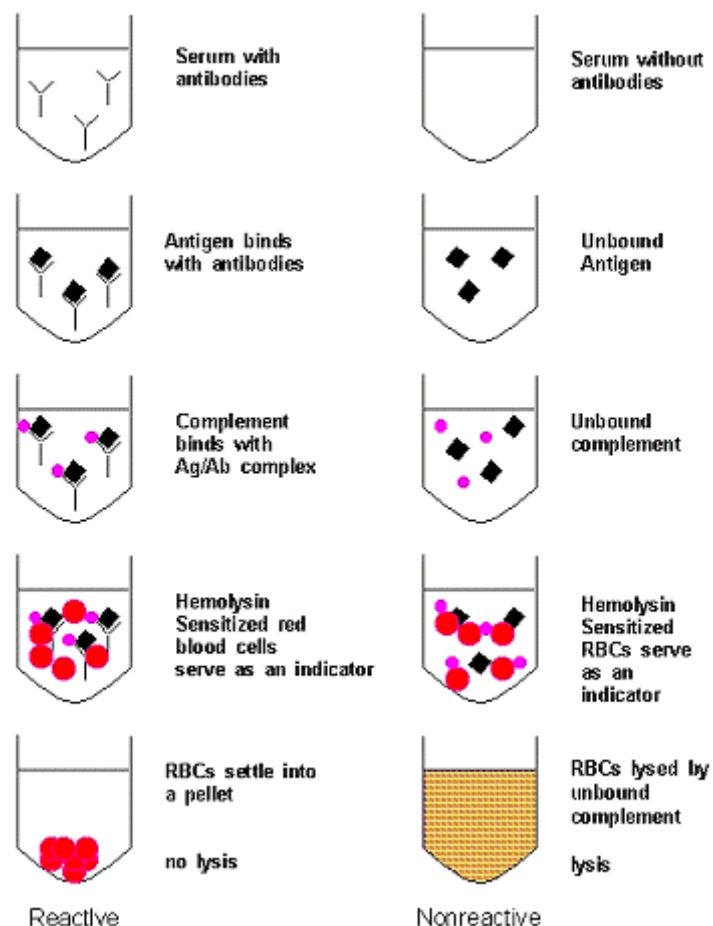
3.1.5. Infekce

Myši byly po dobu 7 dnů ponechány aklimatizaci a poté byly ve stáří 70-ti dnů infikovány. V době infekce myši vážily průměrně 20g. Pro infekci byl použit kmen HIF *Toxoplasma gondii*, izolovaný v České Republice. Myši byly infikovány tkáňovými cystami získanými z mozku laboratorně infikovaných myší. Z mozku infikovaných myší byl připraven homogenát ve fyziologickém roztoku. Z připravené suspenze byl vypočítán průměrný počet cyst parazita v jedné kapce. Infekční suspenze byla myším podávána orálně pomocí pipety, kontrolním jedincům byl podán stejným způsobem fyziologický roztok. K infekci bylo použito 15 cyst.

3.2. Metody

3.2.1. KFR test (Komplement fixační reakce)

Úspěšnost infekce byla testována po skončení experimentu pomocí KFR testu. Séra byla testována v Národní referenční laboratoři pro toxoplasmózu, u všech myší byla infekce potvrzena. KFR je sérologická metoda, která funguje na základě interakce antigenu a protilátky. Přítomnost protilátek v séru jedince je prokazována na základě vyvázání komplementu (součást imunitního systému) na komplex protilátky a antigenu. Pokud se tato reakce děje na povrchu buňky, tak dochází k tvorbě pórů v membráně a k lyzi buňky. Každý jedinec se liší v množství komplementu přítomného v séru. Aby došlo ke standardizaci metody, byla testovaná séra nejprve tepelně deaktivována, aby došlo ke zničení komplementu testovaného jedince a ten byl následně nahrazen známým množstvím standardního komplementu. Zahřátí nemá vliv na protilátky. Přidáno bylo i známé množství antigenu, který se váže na protilátky v séru testovaného jedince. Pokud protilátky jsou v séru přítomny, tedy došlo k úspěšné infekci, navážou se na antigen a na takto vytvořený komplex se naváže přidáný standardní komplement. Jako indikátor infekce byly použity beraní krvinky. Pokud je v séru vytvořený komplex antigen-protilátka, na který je vyvázaný komplement, krvinky nelyzují a klesají ke dnu. Pokud není komplement vyvázan z důvodu nepřítomnosti protilátek, váže se na senzitivované krvinky, dochází k jejich lyzi a zabarvení séra do růžova a k infekci jedince parazitem nedošlo. (McGraw-Hill Higher Education 2005; http://www.dshs.state.tx.us/LAB/serology_cf.shtm) (Obr.14).



Obr. 14 Schéma KFR testu (komplement fixační reakce)
http://www.dshs.state.tx.us/LAB/serology_cf.shtm

3.2.2. Odběr moči

Moč byla odebírána třikrát za týden v přibližně stejnou hodinu. Každý jedinec byl přendán do čisté plastové nádoby, ve které byl ponechán do té doby, než se vymočil. Moč poté byla odebrána pomocí pipety a čisté špičky do mikrozkuřavky a byla skladována v -20°C do doby použití. Moč byla použita pro měření hladiny LH hormonu.

3.2.3. Odběr krve

Krev byla odebrána na konci pokusu po usmrcení myši ze srdce pomocí jehly. Z odebrané krve bylo získáno sérum (stočení na 1000 otáček po dobu 10 min). Sérum bylo testováno na úspěšnost infekce pomocí KFR testu.

3.2.4. Histometrická analýza

Varlata odebraná při usmrcení experimentálních myši na konci pokusu byla zmražena v tekutém dusíku a poté skladována v -80°C . Pro histometrickou analýzu byly z varlat pomocí

kryostatu připraveny kryorezy, které byly nadále barveny a podrobeny zkoumání pomocí světelného mikroskopu.

3.2.4.1. Příprava kryorezů

Varlata byla na dobu 24 hodin umístěna do zkumavky se 30% roztokem sacharózy v PBS, který sloužil jako kryoprotektivum. Zkumavka byla po celou dobu ponechána v lednici. Ve chvíli úplného prosycení klesla varlata na dno zkumavky (Cavallotti et al. 1984; Douglas et al. 1986). Pro přípravu kryorezů byla varlata zafixována do *tissue teku* a ponechána v kryostatu po dobu 3 hodin v teplotě -25°C, aby došlo k úplnému zatuhnutí a nedošlo při řezání k poškození tkáně. Varlata byla nařezána na řezy o tloušťce 5µm. Řezy byly umístěny na speciální sklička *Superfrost plus* a sklička umístěna na vyhřívanou destičku, aby došlo k zaschnutí preparátu. Po zaschnutí byly řezy permeabilizovány zmraženým acetonem po dobu 10 min.

3.2.4.2. Histologické barvení

Poté byly řezy barveny pomocí hematoxylinu a eosinu a zamontovány do kanadského balzámu. Hematoxylin je bazické barvivo, které barví modrofialově jádra buněk, eosin je kyselé barvivo, které barví růžově cytoplasmu buňky. Barvení v hematoxylinu trvalo kolem 3 minut, poté byly preparáty opláchnuty ve vodovodní vodě a okyseleném alkoholu (80% alkohol s HCl). Následně byly opláchnuty ve vodě s NaHCO₃, vodovodní vodě, barveny v eosinu po dobu 2 minut a opět opláchnuty ve vodovodní vodě. Pro odvodnění byly preparáty po dobu 3 minut v 80% a 96% alkoholu a po dobu 5 minut ve 100% alkoholu a prosyceny xylenem v celkovém čase 10 minut. Připravené preparáty byly podrobeny histometrické analýze pomocí světelného mikroskopu.

3.2.4.3. Histologická analýza

V rámci analýzy byly u každého jedince hodnoceny parametry odrážející reprodukční fitness jedince. U 50-ti náhodně vybraných semenotvorných kanálků byl měřen jejich nejmenší průměr (PR) pomocí programu Spot advanced software 5.0 a u 20-ti příčných řezů semenotvornými kanálky byl zaznamenán průměrný počet Sertoliho buněk (SB), primárních leptotenních spermatocytů (LS), sférických spermatid (S) a počet primárních leptotenních spermatocytů na 250 Sertoliho buněk (index250) (Amman and Berndtson 1986; Berndtson et al. 1989).

Legenda histometrie:

1) Průměrný počet parametrů SB, LS a S na semenotvorný kanálek

- SB- Sertoliho buňka
- LS- primární leptotenní spermatocyt
- S- spermatida
- hodnoceno v rámci 20-ti kanálků u každého jedince

2) Nejmenší průměr semenotvorného kanálku (PR)

- hodnoceno v rámci 50 náhodně vybraných kulatých kanálků

3) Poměr primárních leptotenních spermatocytů na 250 Sertoliho buněk (index250)

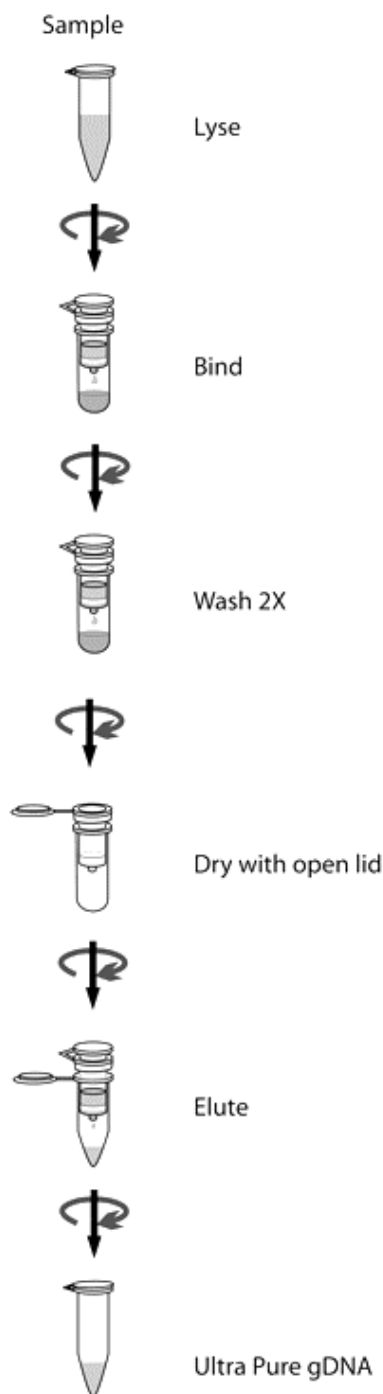
3.2.5. Měření hladiny LH hormonu

Pro kvantitativní stanovení koncentrace luteinizačního hormonu byla použita souprava *ST AIA-PACK LH II* od společnosti *Tosoh Bioscience*. Koncentrace LH byla měřena v moči experimentálních myší. LH je glykoprotein, který je tak jako FSH, HCG a TSH složen z α a β řetězců. α -řetězce jsou prakticky identické u všech čtyřech hormonů, zatímco β -řetězce jsou odlišné a udávají jak specifickou biologickou aktivitu, tak imunologickou, charakteristickou pro každý hormon. Ke stanovení koncentrace LH byla použita monoklonální protilátka, která poskytuje nutnou specifitu a senzitivitu stanovení. *ST AIA-PACK LH* je sendvičový imunoenzymový test, který se provádí na analyzátoru *Tosoh AIA*. LH přítomný v testovaném vzorku se váže s monoklonální protilátkou imobilizovanou na magnetických částicích a monoklonální protilátku značenou enzymem. Částice jsou promývány, aby se odstranila nenavázaná protilátka značená enzymem, a pak jsou inkubovány s fluorogením substrátem (4MUP). Množství enzymem značené protilátky vázané na částice je přímo úměrné koncentraci LH ve vzorku. Kalibrační křivka je sestavena na základě známých koncentrací a neznámé koncentrace vzorků se počítají podle této křivky. Plastové kelímky, ve kterých probíhá detekce, obsahují 12 lyofilizovaných magnetických mikrokuliček potažených myší monoklonální protilátkou anti-LH a 100 μ l myší monoklonální konjugované s hovězí alkalickou fosfatázou. Obsahují 0,1% azidu sodného jako konzervačního prostředku. Systémy AIA načítají hodnotu fluorescence vzniklé při reakci a automaticky ji převádějí na koncentraci LH v mIU/ml (protokol *ST AIA-PACK LH II* od společnosti *Tosoh*)

3.2.6. Izolace DNA

DNA byla izolována z testikulární tkáně pomocí soupravy *GenEluteTM Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit* od společnosti Sigma Aldrich. Izolovaná DNA byla použita k detekci globální a specifické míry DNA metylace.

Zmražená testikulární tkáň byla ponechána v pokojové teplotě, aby rozmrzla. Rozmrzlá tkáň byla rozstříhána na malé kousky, aby byla lyze buněk více efektivní. Po rozstříhání tkáně byl přidán lyzační roztok, díky kterému dochází k lyzi buněk a k denaturaci makromolekul. Do lyzačního roztoku s tkání se přidává také enzym proteinkináza K, která štěpí proteiny včetně histonů vázajících se na DNA. Vzorek byl v roztoku inkubován při 55°C po dobu 4 hodin, než došlo k úplné lyzi buněk tkáně. Enzymy štěpící DNA, nukleázy, jsou inhibovány látkami přítomnými v lyzačním roztoku, takže nedochází k degradaci uvolněné DNA. Po přidání ethanolu za přítomnosti chaotropních solí se DNA uvolněná z lyzujících buněk váže na silikátovou membránu v kolonce, zatímco ostatní molekuly jí protečou. Po promytí roztoky pro odstranění nečistot dochází k vymytí navázané DNA ze silikátové membrány z kolonky do mikrozkuřavky pomocí Tris-EDTA roztoku (Obr. 15). Koncentrace vyizolované DNA byla změřena pomocí nanodropu a uchována v teplotě -20°C. (protokol k soupravě *GenEluteTM Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit* od společnosti *Sigma Aldrich*).

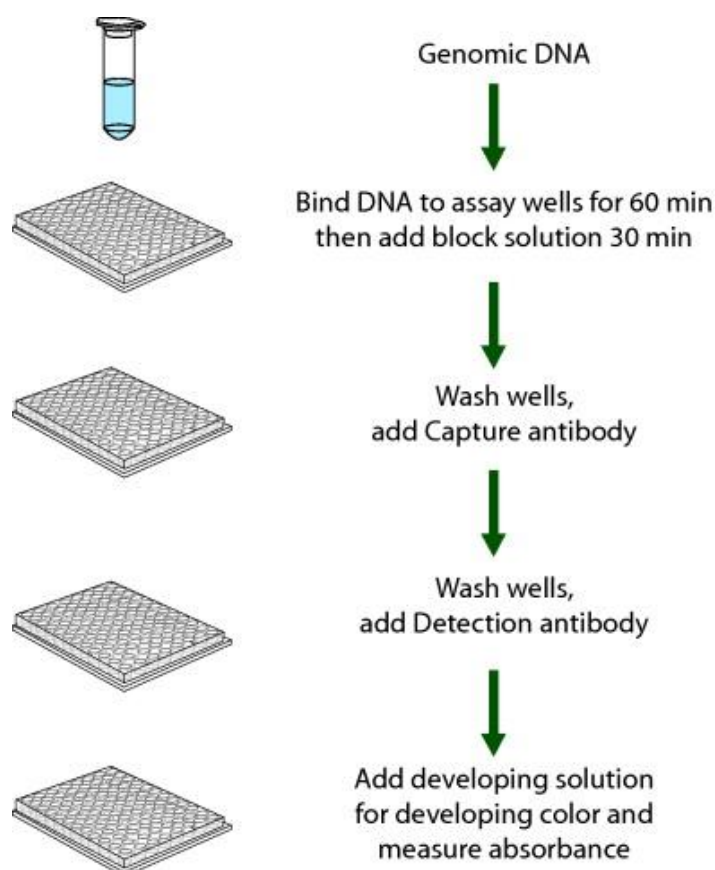


Obr. 15 Schéma izolace DNA pomocí kolonky se silikátovou membránou (Protokol Sigma Aldrich)

3.2.7. Analýza globální metylace

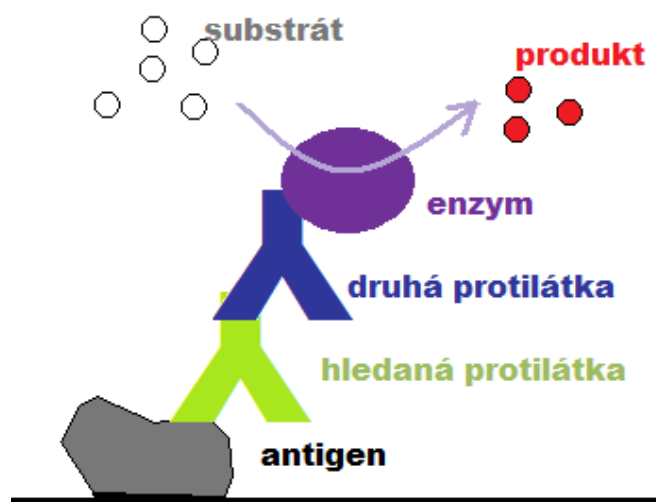
Analýza globální metylace DNA byla provedena pomocí soupravy *Methylated DNA Quantification Kit* od společnosti Sigma Aldrich. Detekce míry globální metylace DNA je založena na principech ELISA metody (z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Ze

standardní metylované DNA, která je součástí soupravy, byla provedena ředící řada o koncentracích 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 12,5 ng, 6,25 ng a 3,125 ng DNA. DNA vzorků byla použita v dublikátech o koncentraci 6,5 ng. Standardní metylovaná DNA i DNA vzorků byla spolu s DNA-vázajícím roztokem přidána do jamek ELISA destičky a inkubována při 37°C po dobu 60-ti minut. Samotný DNA-vázající roztok byl použit jako blank. Po přidání blokujícího roztoku a inkubaci při 37°C po dobu 30 minut, byly roztoky z destičky odstraněny a destička 3-krát promyta pro odstranění nenavázané DNA. Metylce DNA je detekována pomocí *capture* a *detection* protilátky a následně kvantifikována spektrofotometricky (Obr.16). Primární protilátka (*capture*) se váže na navázanou DNA. Na primární protilátku se v dalším kroku naváže sekundární protilátka (*detection*) vázající enzym štěpící bezbarvý substrát, který je přítomný ve vyvíjejícím roztoku, na barevný produkt. Barevná reakce byla zastavena pomocí stop roztoku po asi 5 minutách. Míra metylace DNA je úměrná naměřené absorbanci při 450nm pomocí spektrofotometru a přepočtena na procenta pomocí vzorce (Obr. 17) (protokol k soupravě *Methylated DNA Quantification Kit* od společnosti *Sigma Aldrich*).



Obr. 16 Metoda analýzy globální metylace DNA

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/mdq1?lang=en®ion=CZ>



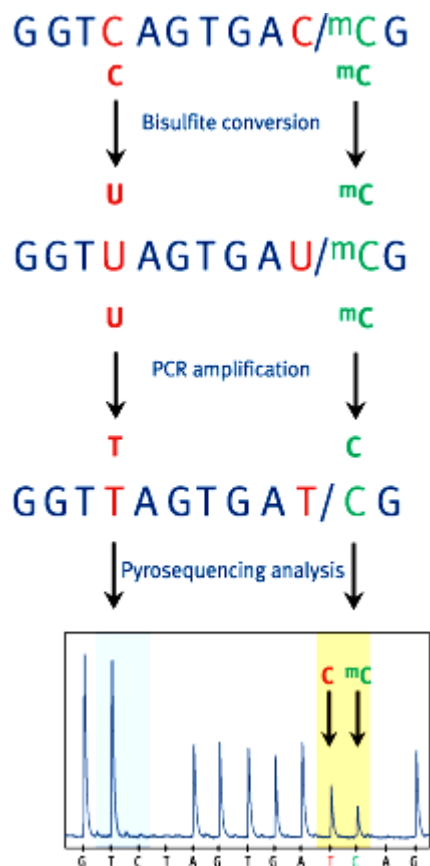
$$\% \text{ metylace} = \frac{A_{450 \text{ av vzorku}} - A_{450 \text{ av blanku}}}{A_{450 \text{ av standardní DNA}} - A_{450 \text{ av blanku}}} \times 100$$

Obr. 17 Princip metody detekce globální metylace DNA a vzorec pro výpočet míry globální metylace DNA

<http://www.wikiskripta.eu/images/6/6b/Schema-ELISA-capture.png>

3.2.8. Analýza specifické metylace

Analýza specifické DNA metylace genů regulujících spermatogenezi zahrnuje bisulfitovou konverzi DNA testikulární tkáně, následnou PCR reakci a pyrosekvenování (Obr.18). Bisulfitem konvertovaná DNA byla zaslána na pracoviště University Clinic Giessen and Marburg, kde bylo v rámci spolupráce s Dr. Agnieszka Paradowska, PhD provedeno pyrosekvenování, terminální krok analýzy specifické metylace DNA.

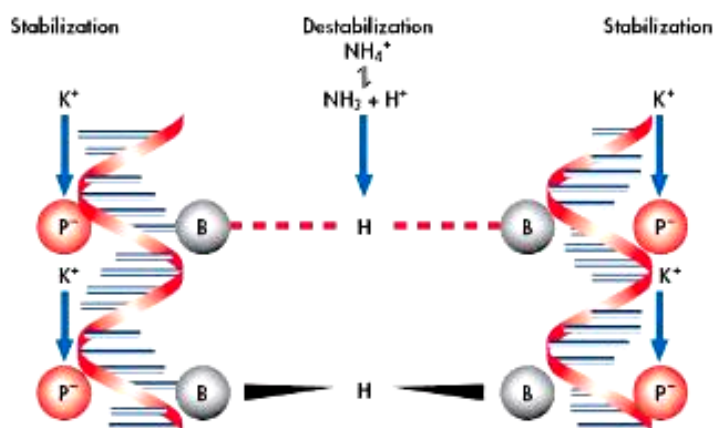


Obr. 18 Princip analýzy specifické DNA metylace (Robert England and Monica Pettersson-Quantitative analysis of methylation at multiple CpG sites by Pyrosequencing)

3.2.8.1. Bisulfitová konverze DNA

Pro bisulfitovou konverzi DNA byla použita souprava *DNA Modification Kit* od společnosti Sigma Aldrich. Při bisulfitové konverzi dochází k denaturaci DNA a bisulfitové modifikaci současně. Během modifikace DNA dochází ke specifické reakci bisulfitu s jednovláknovou DNA (ssDNA) a k deaminaci cytosinu na uracil (Obr.19). Metylovaný cytosin (5mC) s bisulfitem nereaguje. Dochází tedy ke konverzi nemetylovaného cytosinu na uracil, zatímco 5mC zůstává nezměněn. DNA vzorků byla spolu s modifikačním roztokem inkubována při 99°C po dobu 6 minut a ihned poté se pokračovalo s inkubací při 65°C po dobu 90 minut, přičemž látky přítomné v modifikačním roztoku chrání DNA proti chemické degradaci a degradaci teplem. Po inkubaci byla modifikovaná DNA zachycena v kolonce a následně byla čištěna roztoky obsahující etanol (protokol k soupravě *DNA Modification Kit* od společnosti *Sigma Aldrich*). Modifikovaná DNA byla z kolonky vymyta, koncentrace změřena pomocí nanodropu a následně uchována v teplotě -20°C. Konvertovaná DNA byla použita pro PCR reakci, kde se nemetylovaný cytosin projeví jako thymin a metylovaný

s vodíkovými vazbami mezi bazemi B a destabilizují tak slabé vazby mezi mismatched basemi (Obr. 20).



Obr. 20 Amoniové a draselné kationty zvyšují přesnost nasedání primerů na templát (protokol *PyroMark PCR Kit* od společnosti *Qiagen*)

Souprava pro PCR amplifikaci obsahuje *CoralLoad* koncentrát, který zvyšuje specifičnost PCR a výnosy amplifikované DNA. Kromě toho mohou být produkty PCR vzniklé amplifikací v přítomnosti *CoralLoad* koncentráту přímo nanášeny na agarózový gel bez nutnosti přidat gelový *loading* pufr, protože obsahuje reagentie tohoto pufru a dvě barviva - oranžové barvivo a červené barvivo - které usnadňují odhad vzdálenosti DNA migrace v gelu.

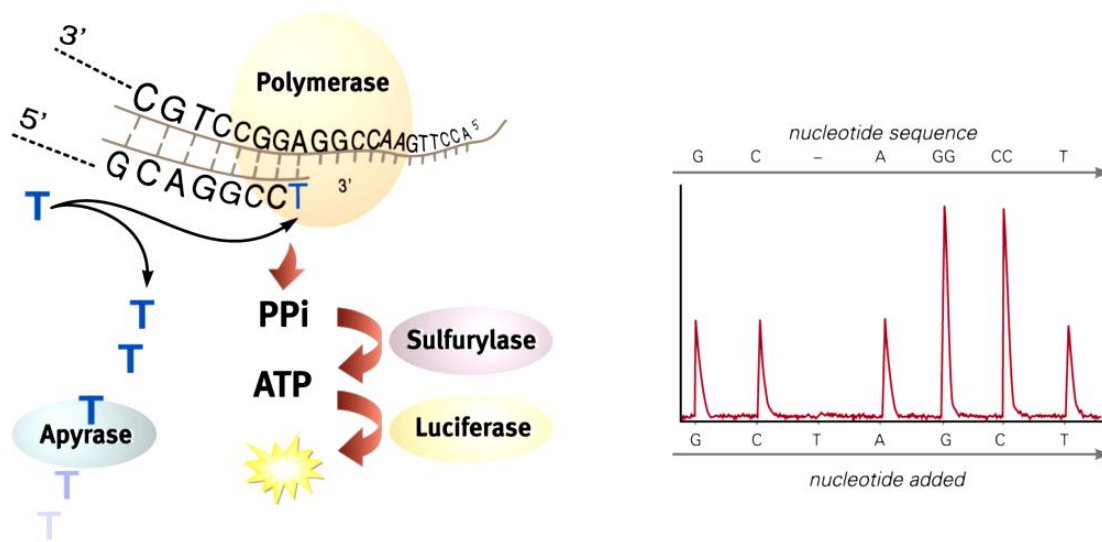
Po 15-ti minutovém iniciačním kroku při 95°C, kdy byla aktivována DNA polymeráza, následoval tří krokový cyklus denaturace při 94°C po dobu 30 sekund, nasedání primerů při teplotě 56°C po dobu 30 sekund, syntézy DNA při teplotě 72°C po dobu 30 sekund a konečné syntézy při teplotě 72°C po dobu 10 minut. Cyklus byl opakován 45-krát a 7μl DNA produktu bylo naneseno na agarózový gel pro zjištění velikosti PCR produktů.

Primery byly navrženy za použití *PyroMark Assay Design Software 2.0*. Program automaticky generuje sady primerů pro PCR i primery pro sekvenování. Každá sada primerů je kvalitativně ohodnocena na základě několika parametrů, které jsou specifické pro analýzu pyrosekvenováním. Jeden z PCR primerů musí být označen biotinem, takže jedno vlákno každého amplikonu je na 5'konci primeru značeno. Po amplifikaci bylo 15μl PCR produktu přeneseno do jamek nové destičky, ve které byl přítomen *binding pufr* s korálky potaženými streptavidinem. Amplikony označené biotinem se váží na korálky a dochází tak k imobilizaci

PCR produkt na korálcích, což je nezbytný krok při přípravě jednovláknového templátu pro pyrosekvenování. Další krok se odehrával v *PyroMark vacuum workstation*, která se skládá ze systému žlábků obsahující roztoky pro denaturaci a čištění DNA. Vakuum vytváří proud přes filtrační sondy v okamžiku, kdy jsou zavedeny do tekutiny. Velké částice, jako jsou korálky s navázanou DNA, nejsou schopny projít filtry a jsou zachyceny. Hlavice se zachycenými korálky s označenou DNA byla umístěna do roztoku s etanolem v prvním žlábků, kde došlo k odstranění PCR komponent, které se neodstranily během zachytávání korálků. V dalším žlábků byl přítomen denaturační roztok, po denaturaci byla vlákna bez navázaného biotinu odstraněna. V dalším žlábků došlo v promývacím roztoku k odstranění denaturačního roztoku z předešlého kroku a zbylé neoznačené DNA. Pro získání DNA templátů po krocích denaturace a čištění DNA byla do *vacuum station* umístěna *PyroMark Q24* destička se sekvenčními primery. Do této destičky byla ponořena vypnutá vakuová hlavice a došlo tak k uvolnění zachycených jednovláknových DNA templátů do roztoku. Templátová DNA se sekvenčními primery byla zahřata na 80°C po dobu 2 minut a poté nechána vystydnout v pokojové teplotě, během toho došlo k nasednutí primerů na templát. Výsledný produkt je použit pro pyrosekvenování (protokol k soupravě *PyroMark PCR Kit* od společnosti *Qiagen*; *PyroMarkVirtualDemo* <http://www.qiagen.com/media/pyrosequencing/20120106/index.html>).

3.2.8.3. Pyrosekvenování

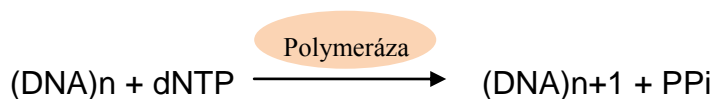
Pyrosekvenování je metoda, která kvantifikuje míru metylace na základě poměru cytosinů/thyminů postupným přidáváním nukleotidů k jednovláknovému DNA templátu. Základem pyrosekvenování je aktivita kaskády 4 enzymů se specifickými substráty. Pokud se přidáný nukleotid přiřadí k templátu, tedy pokud dojde k párování, dojde k uvolnění energie v podobě světelného záření a jeho intenzita je úměrná počtu přiřazených nukleotidů. Výstupem pyrosekvenování je pyrogram, který znázorňuje sekvenci nukleotidů proti výsledné naměřené intenzitě světla. Sekvence nukleotidů je zobrazena v podobě sekvence peaku a kvantitativní zastoupení nukleotidů v podobě výše peaků. Míra metylace se vypočítá pomocí výšek peaků inkorporovaných cytosinů a thyminů (Obr. 21) (Protokol Biotage- Robert England and Monica Pettersson).



$$\% \text{ metylace} = \frac{\text{výška C peaku} \times 100}{\text{výška C peaku} + \text{výška T peaku}}$$

Obr. 21 Princip metody pyrosekvenování, výpočet míry metylace (Robert England and Monica Pettersson- Quantitative analysis of methylation at multiple CpG sites by Pyrosequencing)

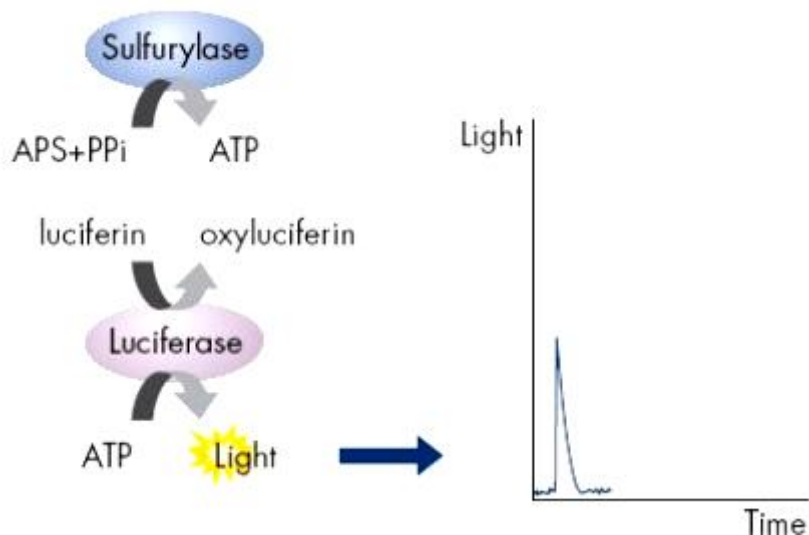
Metoda pyrosekvenování byla provedena na *PyroMark Q24* destičce v *PyroMarkQ24* sekvenátoru a výsledky byly analyzovány pomocí *PyroMarkQ24* softwaru. Prvním krokem metody pyrosekvenování byla hybridizace primeru s templátovou ssDNA a inkubace za přítomnosti enzymů- DNA polymerázy, ATP sulfurylázy, luciferázy a apyrázy a substrátů- adenosin5'fosfosulfátu (APS) a luciferinu. Druhým krokem je přidání jednoho ze čtyř deoxyribonukleotidtrifosfátů (dNTP). Pokud je přidán dNTP komplementární k bázi templátu, DNA polymeráza katalyzuje jeho inkorporaci. Během inkorporace se uvolní pyrofosfát (PPi) v množství, které odpovídá počtu zařazených dNTP (Obr. 22).



Obr. 22 Aktivita DNA polymerázy a uvolnění PPi (Pyrosequencing – a service provided by varionostic)

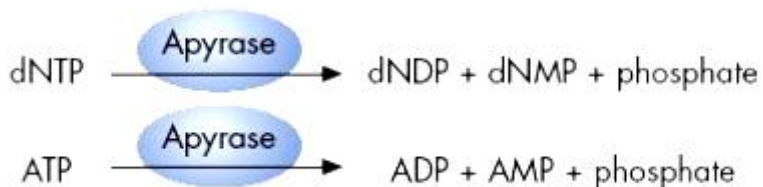
Ve třetím kroku enzym sulfuryláza konvertuje PPi na ATP za přítomnosti APS. Takto generované ATP umožňuje aktivitu dalšímu enzymu, luciferáze, která konvertuje protein

luciferin na oxyluciferin. Při této reakci dochází k uvolnění energie v podobě světelného záření. Množství záření je přímo úměrné množství generovaného ATP. Generované světlo je detekováno pomocí kamery a znázorněno jako peak v pyrogramu (Obr. 23).



Obr. 23 Aktivita enzymů pyrosekvenování a produkce světla
<http://www.qiagen.com/products/pyromarkq96md.aspx>

Ve čtvrtém kroku enzym apyráza, nukleotid degradující enzym, degraduje ATP a neinkorporované dNTP. Dojde tak k zastavení světelné reakce a regeneraci systému (Obr. 24).



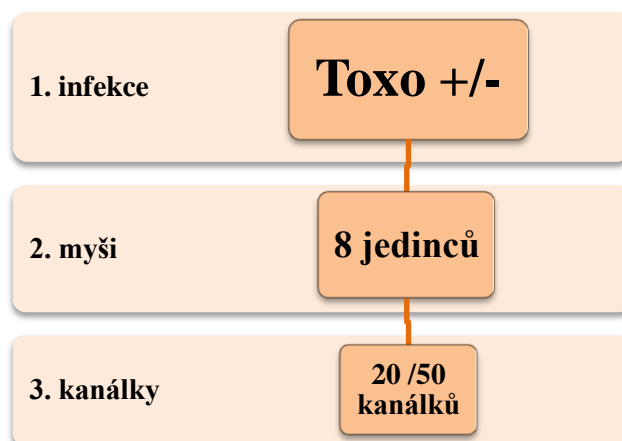
Obr. 24 Aktivita enzymu apyráza
<http://www.qiagen.com/products/pyromarkq96md.aspx>

Následně je přidán další dNTP a cyklus se opakuje. Výsledky jsou zaznamenávány v pyrogramu (protokol *Varionostic Pyrosequencing*).

3.2.9. Statistické metody

Experimentální data byla analyzována pomocí STATISTICA 6.0. a GraphPad Prism 5.04. Všechny datové soubory byly před použitím parametrických statistických testů testovány na normalitu a homogenitu. Normalita byla testována v celém souboru, uvnitř obou skupin i uvnitř všech myší. Ukázalo se, že všechny proměnné byly normálně rozložené, a proto byly použity parametrické testy a charakteristiky. Z deskriptivních charakteristik byl použit průměr (Mean), směrodatná odchylka (Std. Deviation), šikmost (Skewness) a špičatost (Kurtosis).

Rozdíly v počtu jednotlivých buněčných typů a tubulárního průměru mezi Toxo+ a Toxo- skupinami byly testovány pomocí analýzy rozptylu s dvojným tříděním (Nested two-way ANOVA) s jednotlivými zvířaty jako druhým parametrem. Faktory v této analýze rozptylu byly 2. Tyto dva faktory nebyly skřížené, ale jeden do druhého vnořeny. U každé myši bylo dále analyzováno 20 semenotvorných kanálků pro parametry SB, LS a S a 50 semenotvorných kanálků pro parametr PR. Objektem pozorování byly semenotvorné kanálky (Obr. 25).



Obr. 25 Schéma tří úrovní pozorování

Následně byla uvnitř každé skupiny provedena analýza rozptylu s jednoduchým tříděním, kde faktorem byla myš a objektem pozorování semenotvorné kanálky. Její výsledky byly použity pro odhad vnitroskupinového korelačního koeficientu (ICC= intraclass correlation) a jeho 95% konfidenčního intervalu (C.I.). Tento koeficient vyjadřuje míru interindividuální variability (mezi zvířaty) ku celkové variabilitě.

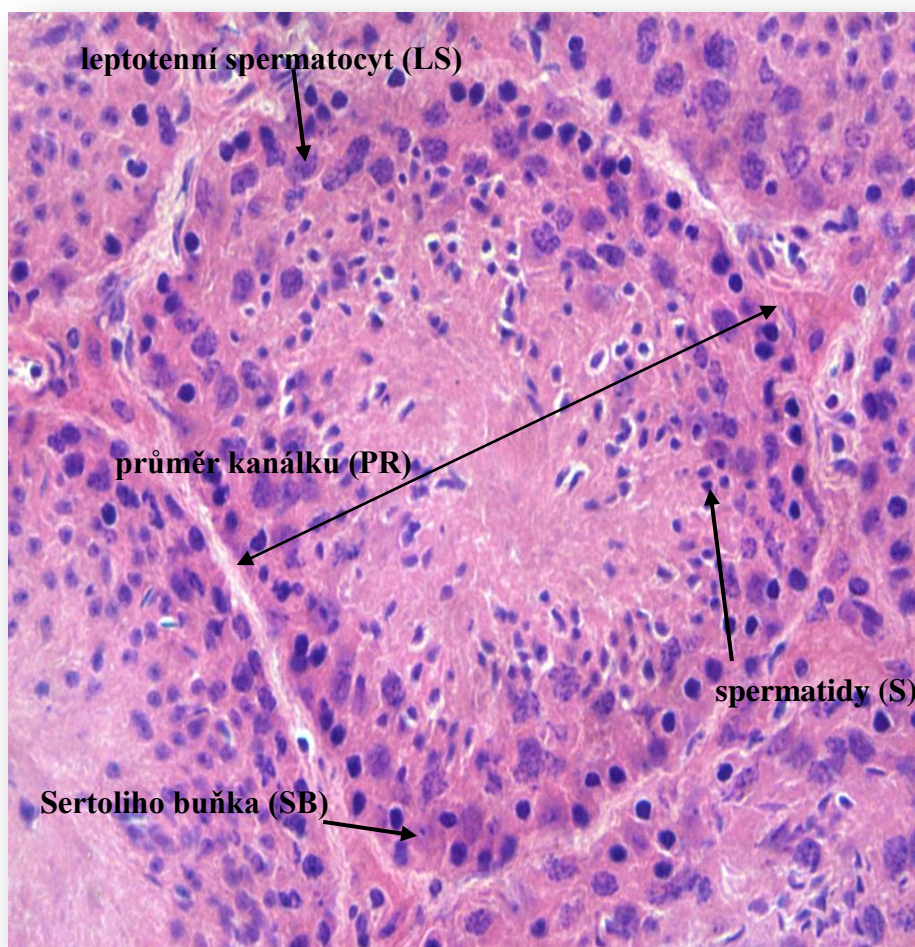
Míra vztahu mezi průměrnými hodnotami parametrů na úrovni myší, mezi nimi navzájem (n=8), byla vyjádřena pomocí Pearsonovy korelace a lineární regrese. Za signifikantní výsledky byly považovány hodnoty $p < 0,05$.

Rozdíly v hladině LH a globální DNA metylaci mezi Toxo+ a Toxo- byly analyzovány t-testem. Rozdíly ve specifické metylaci *Hspa1*, *Crem* a *Creb1* byly analyzovány pomocí one-way ANOVA, Newman-Keuls multiple comparison test byl použit jako post hoc. Hodnota p rovna nebo nižší 0,05 byla považována za významnou, * p-hodnota $\leq 0,05$ (** p $\leq 0,01$ a *** p $\leq 0,001$).

4. Výsledky

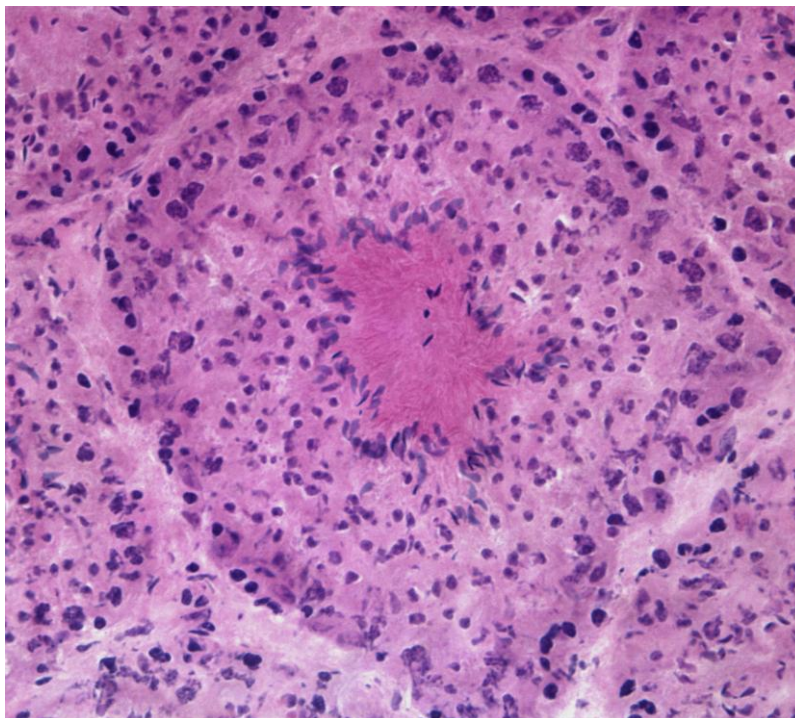
4.1. Histometrická analýza testikulární tkáně

Parametry hodnocené v rámci histometrické analýzy jsou prezentovány na fotografii vybraného příčného řezu semenotvorným kanálkem varlete kontrolního jedince (Obr.26). Reprezentativní fotografie příčných řezů semenotvorných kanálků infikovaného a kontrolního jedince jsou prezentovány na Obr. 27. Na první pohled se testikulární tkáň mezi skupinami nijak zvlášť neliší, rozdíly v histometrických parametrech se projeví až po statistickém zpracování dat.

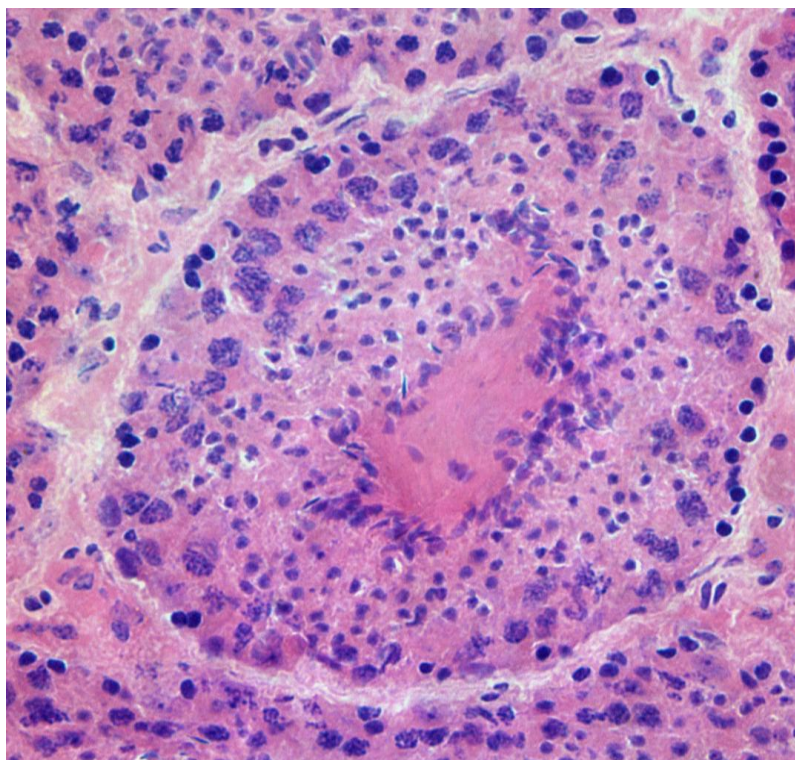


Obr. 26 Parametry hodnocené v histometrické analýze (SB, LS, S, PR) prezentované na fotografii kontrolního jedince, 40 x zvětšeno

Toxo+



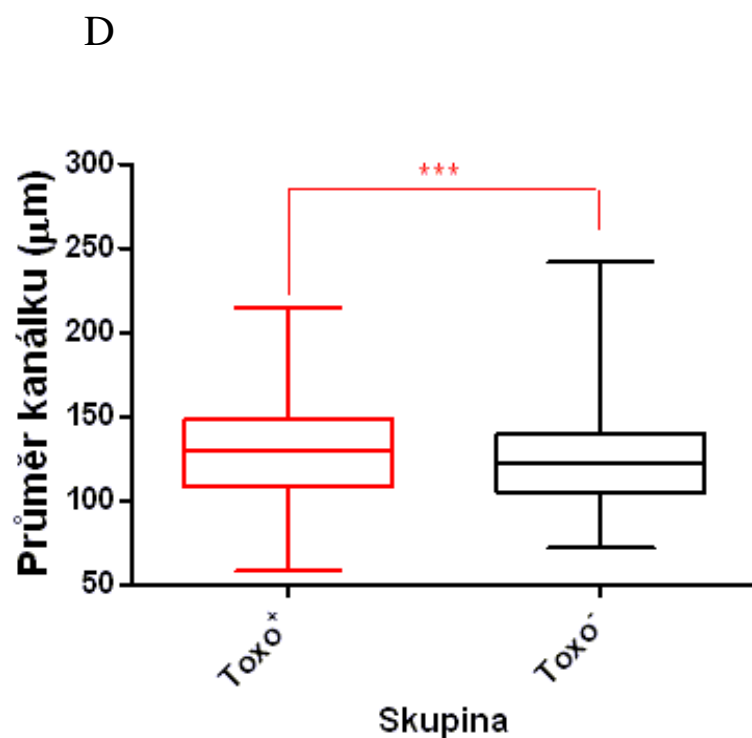
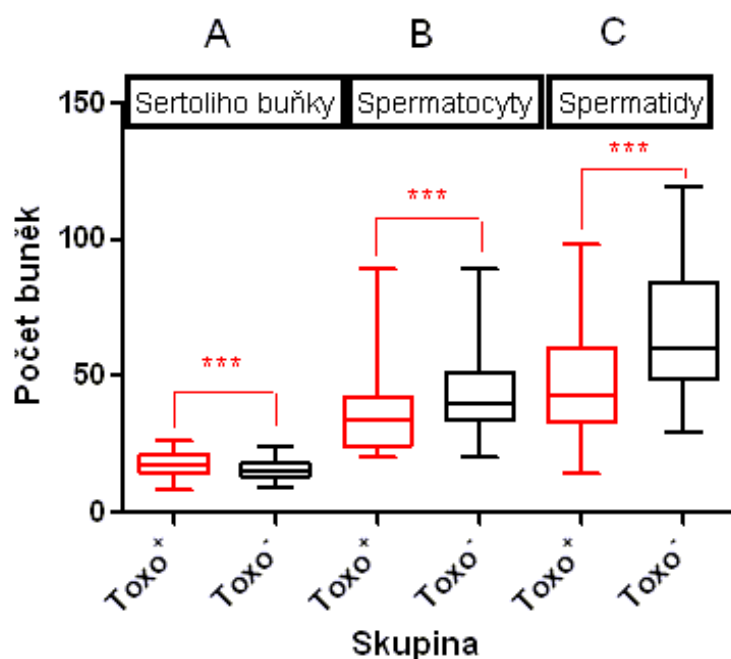
Toxo-



Obr. 27 Fotografie příčných řezů semenotvorných kanálků infikovaného a kontrolního jedince, 40 x zvětšeno

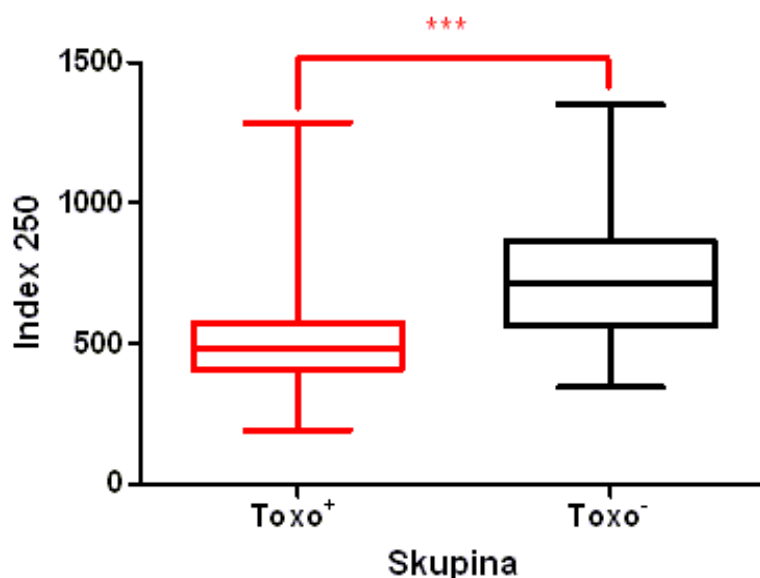
Průměrný počet Sertoliho buněk (SB), leptotenních spermatocytů (LS) a spermatid (S) v rámci semenotvorného kanálku a průměrný průměr semenotvorných kanálků (PR) u skupiny Toxo+ (infikovaní jedinci) a skupiny Toxo- (kontrolní jedinci) je reprezentován na

grafech A-D (Obr. 28). Rozdíly mezi skupinami byly ve všech pozorovaných parametrech statisticky významné ($p < 0,001$). U skupiny infikovaných jedinců byl v rámci semenotvorného kanálku pozorován větší průměrný počet Sertoliho buněk ($17,6 \pm 4,0$ vs. $15,1 \pm 3,2$) a průměr semenotvorných kanálků ($129,6 \pm 32,0$ vs. $125,7 \pm 30,2$) a nižší průměrný počet leptotenních spermatocytů ($35,5 \pm 12,8$ vs. $43,6 \pm 15,0$) a spermatid ($47,0 \pm 19,9$ vs. $66,4 \pm 23,7$) vůči skupině kontrolních jedinců.



Obr. 28 Histometrická analýza počtu Sertoliho buněk (A), leptotenní spermatocytů (B), spermatid (C) a průměru semenotvorných kanálků (D) u Toxo+ a Toxo- skupiny. Střední linie zobrazuje aritmetický průměr, box zobrazuje směrodatnou odchylku a vnější linky zobrazují minimum a maximum měření. (***) $p \leq 0,001$).

U každého experimentálního jedince v obou skupinách byl stanoven počet primárních leptotenních spermatocytů na 250 Sertoliho buněk (Index250). Výsledky jsou prezentovány v grafu (Obr. 29). Rozdíl v tomto poměru mezi skupinami je statisticky významný (***) $p < 0,001$). Počet spermatocytů na 250 Sertoliho buněk byl signifikantně snížen u skupiny infikovaných jedinců Toxo+ ($528,4 \pm 214,4$ vs. $675,79 \pm 175,63$) oproti kontrolní skupině Toxo-



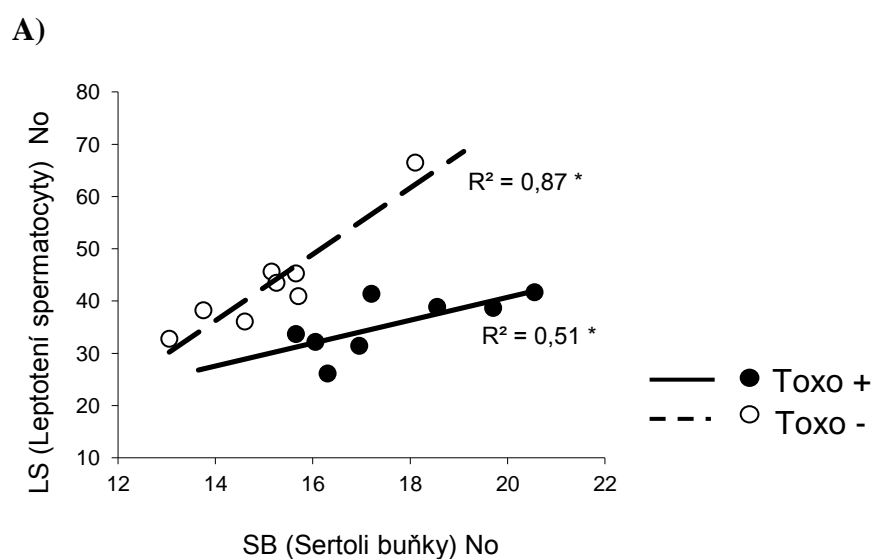
Obr. 29 Rozdíl v poměru leptotenních spermatocytů na 250 Sertoliho buněk (Index250) mezi Toxo+ a Toxo- skupinami. Střední linie zobrazuje aritmetický průměr, box zobrazuje směrodatnou odchylku a vnější linky zobrazují minimum a maximum měření. (***) $p \leq 0,001$).

Výsledky deskriptivní statistiky a vnitroskupinové korelační koeficienty jsou pro obě skupiny shrnuty v tabulce 1.

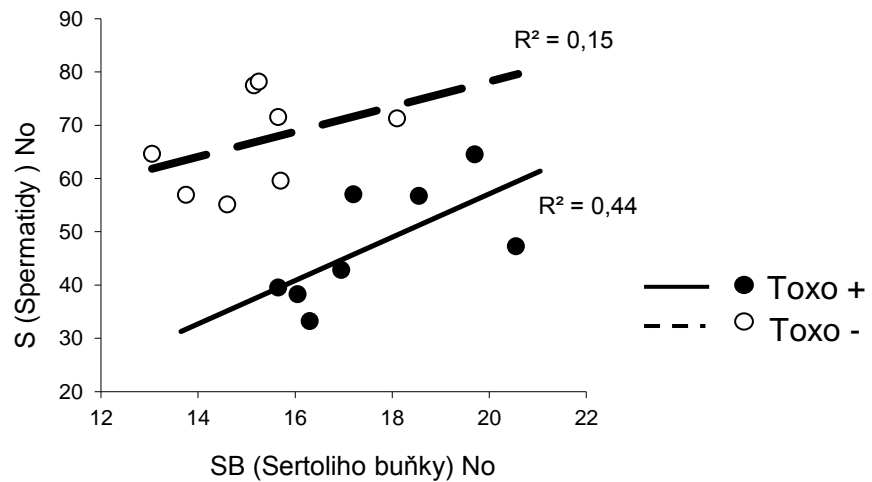
Skupina	Parametr	Průměr	SD	Min	Max	N	ICC	(95% C.I.)
Toxo+	SB (No.)	17.6	4.0	8.0	26.0	160	.780	(.479, .948)
	LS (No.)	35.5	12.8	20.0	89.0	160	.764	(.440, .944)
	S (No.)	47.4	20.3	14.0	101.0	160	.866	(.683, .968)
	PR (μm)	131.5	32.2	58.2	223.1	400	.836	(.620, .961)
	Index250	506.9	151.4	192.3	1285.7	160	.763	(.438, .943)
Toxo-	SB (No.)	15.2	3.2	9.0	24.0	160	.807	(.541, .954)
	LS (No.)	43.6	15.0	20.0	89.0	160	.934	(.844, .984)
	S (No.)	66.8	23.9	29.0	119.0	160	.684	(.251, .925)
	PR (μm)	121.4	29.9	63.3	241.7	400	.894	(.754, .974)
	Index250	722.6	198.2	343.6	1350.0	160	.807	(.542, .954)

Tabulka 1. Deskriptivní statistika a míra korelačního koeficientu.

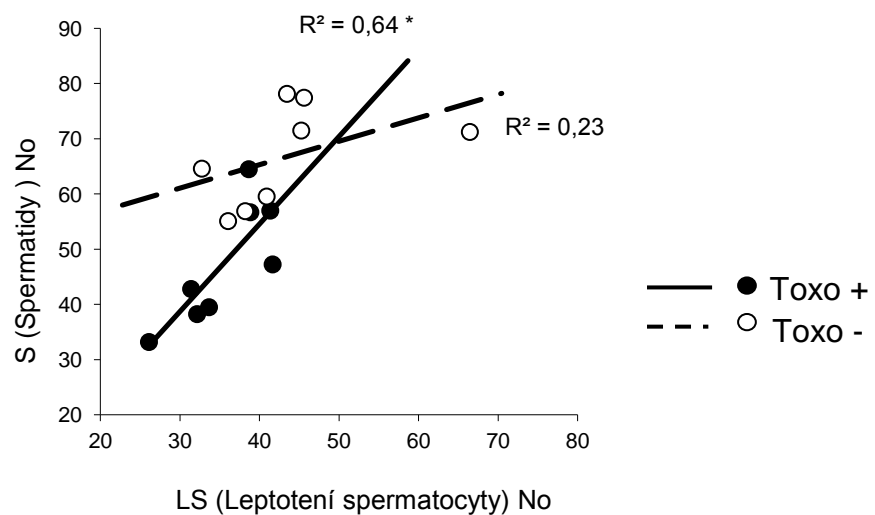
Regresní analýza určuje míru korelace mezi jednotlivými naměřenými hodnotami vybraných histometrických parametrů u Toxo+ a Toxo- skupin. Výsledky regresní analýzy, provedené u obou skupin zvlášť, jsou společně graficky znázorněny na Obr. 30 (A-C). V každém grafu se nacházejí dvě regresní přímky proložené průměrnými hodnotami jedinců ve skupině. U každé přímky je uveden koeficient determinace R^2 , což je druhá mocnina korelačního koeficientu, který byl ve třech případech signifikantní, (v grafech označeno hvězdičkou). Míra korelace mezi parametry SB / LS (Obr. 30 A) a LS / S (Obr.30 C) byla u obou skupin statisticky významná. Míra korelace mezi parametry SB / S (Obr. 30 B) nebyla u obou skupin statisticky významná, což naznačuje, že v rámci této histometrické analýzy nemusí počet Sertoliho buněk odrážet konečný počet maturujících spermatid.



B)

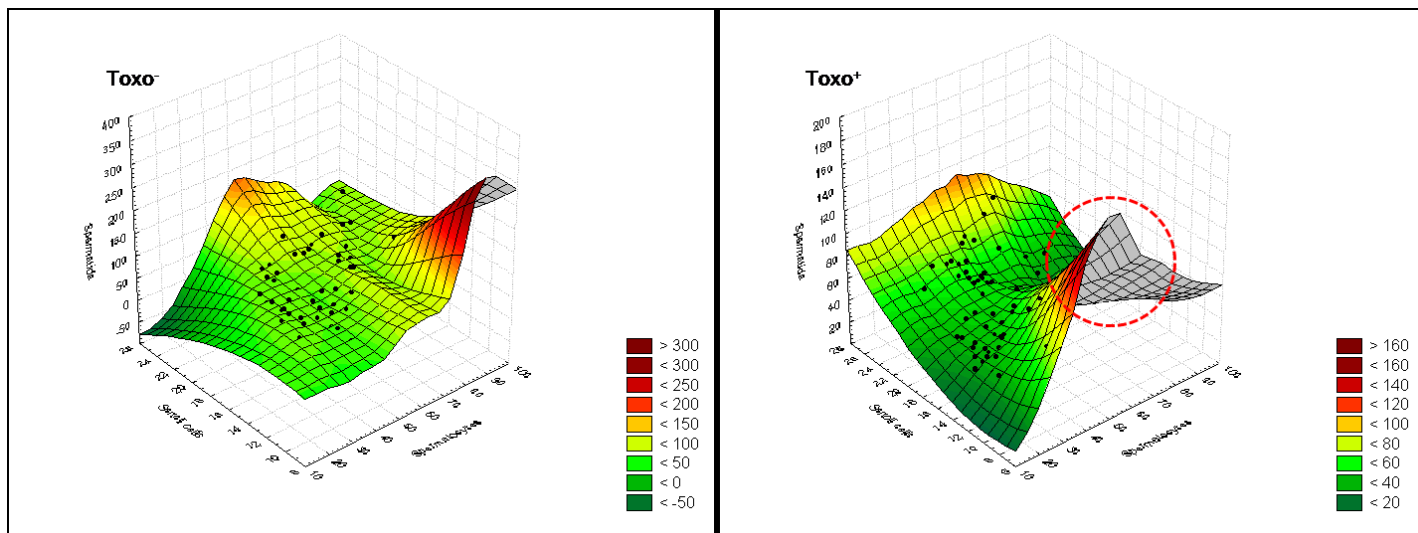


C)



Obr. 30 Regresní model zobrazující míru korelace mezi jednotlivými parametry histometrické analýzy u Toxo+ a Toxo- skupin. A) Sertoliho buňky / Leptotenní primární spermatocyty, B) Spermatidy / Sertoliho buňky, C) Leptotenní primární spermatocyty / Spermatidy. Statisticky významné koeficienty determinace R^2 jsou označeny hvězdičkou.

Rozdíly v počtu spermií v závislosti na počtu Sertoliho buněk a spermatocytů mezi Toxo + a Toxo- skupinu jsou zobrazeny na Obr. 31. Toto rozložení ukazuje, že v Toxo- skupině se počet spermií zvyšuje s počtem spermatocytů. Na druhé straně v Toxo+ skupině je počet spermií v závislosti na počtu spermatocytů v Gaussově rozložení.



Obr.31 3D zobrazení závislosti počtu spermatid (z osa) na počtu primárních leptotenních spermatocytů (x osa) a počtu Sertoliho buněk (y osa) v rámci semenotvorného kanálku. Různé barvy v legendě označují jiný počet spermatid v dané oblasti. Červený kruh zobrazuje hlavní rozdíl mezi Toxo+ a Toxo- skupinou.

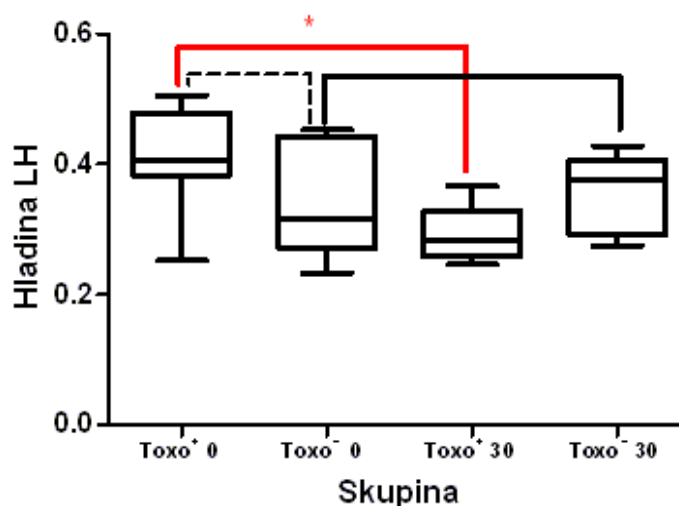
4.2. Detekce hladiny gonadotropního hormonu LH

Z moči experimentálních jedinců byla stanovena koncentrace hladiny LH hormonu. Výsledné koncentrace LH hormonu před a po infekci u obou skupin jsou prezentovány v tabulce 2. V každé skupině nebylo u jednoho jedince možné hladinu hormonu touto metodou detekovat, proto je u každé skupiny 7 jedinců.

	Koncentrace LH hormonu před infekcí mIU/ml	Koncentrace LH hormonu po infekci mIU/ml
Toxo 5+	0,4 (0,4781)	0,1 (0,2928)
Toxo 9+	0,2 (0,3877)	0,1 (0,2823)
Toxo13+	0,4 (0,5058)	0,2 (0,3664)
Toxo16+	0 (0,2517)	0 (0,2683)
Toxo19+	0,2 (0,3824)	0 (0,2576)
Toxo22+	0,3 (0,4048)	0,1 (0,328)
Toxo25+	0,3 (0,4392)	0 (0,2463)
Toxo10-	0,2 (0,3407)	0,3 (0,3759)
Toxo11-	0,1 (0,3695)	0,1 (0,4276)
Toxo13-	0,2 (0,2902)	0,2 (0,2744)
Toxo21-	0,2 (0,373)	0,3 (0,4056)
Toxo23-	0,1 (0,291)	0,1 (0,3637)
Toxo31-	0,1 (0,275)	0,2 (0,384)
Toxo32-	0,1 (0,2715)	0,2 (0,2913)

Tabulka 2. Koncentrace LH hormonu v moči experimentálních jedinců před a po infekci. Čísla v závorce prezentují přesné hodnoty měření, které sloužily ke statistické analýze.

Hladina LH hormonu (arbitrární jednotky) v jednotlivých experimentálních skupinách Toxo+ a Toxo- v předinfekční a poinfekční fázi onemocnění jsou ukázána na grafu (Obr. 32). Výsledky ukazují statisticky významný rozdíl v hladině LH uvnitř Toxo+ skupiny mezi předinfekční a poinfekční fází, kde byla hladina LH snížena ($0,407 \pm 0,082$ vs. $0,291 \pm 0,042$) (* $p \leq 0,05$) po 30-ti denní infekci parazitem. Uvnitř Toxo- skupiny nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl ($0,339 \pm 0,084$ vs. $0,360 \pm 0,057$) ($p \geq 0,05$).



Obr. 32 Hladina LH hormonu v moči u Toxo+ a Toxo- skupiny v den 0 (před infekcí) a v den 30 (konec infekčního období). Středová linka zobrazuje aritmetický průměr, box zobrazuje směrodatnou odchylku a vnější linky minimum a maximum měření. Přerušovaná čára označuje statisticky nevýznamný rozdíl mezi Toxo+ a Toxo- skupinou na začátku experimentu. (* p -hodnota $\leq 0,05$).

4.3. Analýza epigenetické modifikace DNA v testikulární tkáni

Testikulární DNA experimentálních jedinců byla podrobena analýze detekce míry globální a specifické metylace.

4.3.1. Analýza globální metylace DNA testikulární tkáně

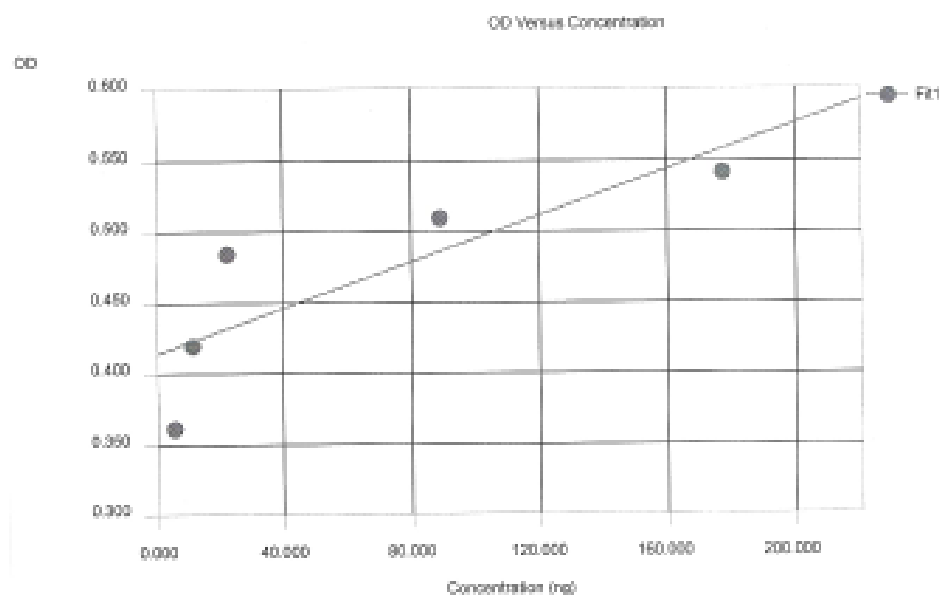
Kvantifikace globální míry DNA metylace slouží jako první ukazatel, zda je *Toxoplasma gondii* schopná způsobit regulační změnu v míře metylace. Míra globální metylace byla testována metodou ELISA na základě detekce absorbance u standardní metylované DNA a DNA vzorků pomocí spektrofotometru. Míra metylace DNA vzorků byla přepočtena na procenta na základě vzorce (Obr.33).

$$\% \text{ metylace} = \frac{A_{450 \text{ av vzorku}} - A_{450 \text{ av blanku}}}{A_{450 \text{ av standardní DNA}} - A_{450 \text{ av blanku}}} \times 100$$

Obr. 33 Vzorec pro přepočet míry globální DNA metylace vzorků na % (protokol *Imprint Methylated DNA Quantification Kit* od společnosti *Sigma Aldrich*)

Měření míry globální metylace bylo provedeno ve třech opakováních. U každého měření byla stanovena standardní křivka metylované DNA, podle které byla následně stanovena míra metylace vzorků v procentech.

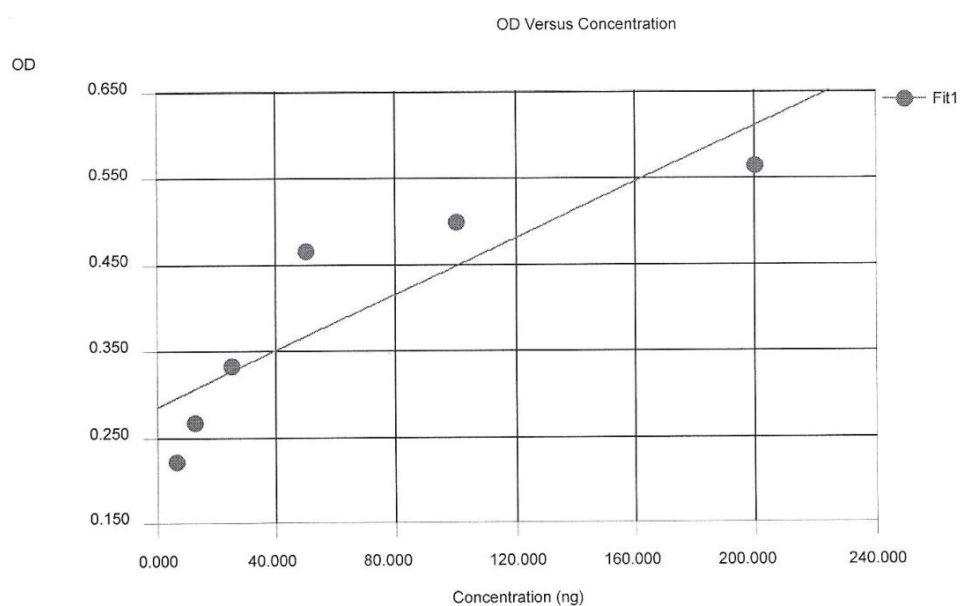
Křivka standardní metylace a výsledky míry metylace vzorků pro jednotlivá měření jsou prezentovány v grafech (Obr. 34, Obr. 35, Obr. 36) a tabulkách (3,4,5).



Obr. 34 Standardní křivka kontrolní metylované DNA- 1. měření

Toxo1+	$(0,715-0,059)/(0,541-0,059)$	132,20%	Toxo10-	$(0,667-0,059)/(0,541-0,059)$	123,30%
Toxo5+	$(0,684-0,059)/(0,541-0,059)$	119,80%	Toxo11-	$(0,538-0,059)/(0,541-0,059)$	99,50%
Toxo9+	$(0,614-0,059)/(0,541-0,059)$	113,50%	Toxo13-	$(0,695-0,059)/(0,541-0,059)$	128,50%
Toxo13+	$(0,715-0,059)/(0,541-0,059)$	126,70%	Toxo21-	$(0,671-0,059)/(0,541-0,059)$	124,00%
Toxo16+	$(0,737-0,059)/(0,541-0,059)$	136,20%	Toxo22-	$(0,501-0,059)/(0,509-0,059)$	98%
Toxo19+	$(0,849-0,059)/(0,541-0,059)$	156,90%	Toxo23-	$(0,668-0,059)/(0,541-0,059)$	123,50%
Toxo22+	$(0,852-0,059)/(0,541-0,059)$	157,50%	Toxo31-	$(0,655-0,059)/(0,541-0,059)$	121,00%
Toxo25+	$(0,748-0,059)/(0,541-0,059)$	138,20%	Toxo32-	$(0,732-0,059)/(0,541-0,059)$	135,30%

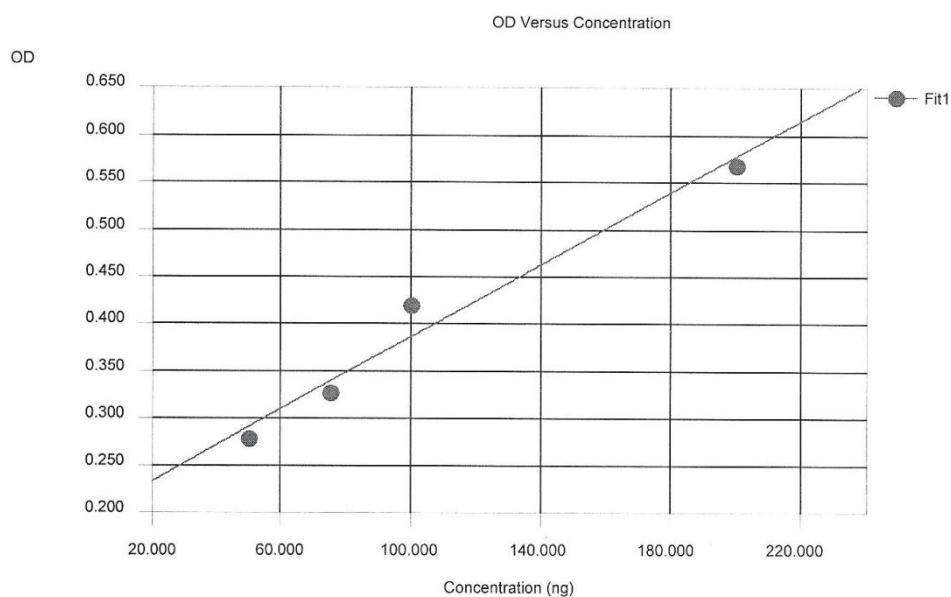
Tabulka 3. Výpočet míry globální DNA metylace u experimentálních jedinců- 1. měření



Obr. 35 Standardní křivka kontrolní metylované DNA- 2. měření

Toxo1+	$(0,243-0,059)/(0,222-0,059)$	109,50%	Toxo10-	$(0,249-0,059)/(0,268-0,059)$	92,90%
Toxo5+	$(0,265-0,059)/(0,268-0,059)$	98,90%	Toxo11-	$(0,188-0,059)/(0,222-0,059)$	84,70%
Toxo9+	$(0,269-0,059)/(0,268-0,059)$	100,40%	Toxo13-	$(0,271-0,059)/(0,268-0,059)$	96,00%
Toxo13+	$(0,260-0,059)/(0,268-0,059)$	97,00%	Toxo21-	$(0,256-0,059)/(0,268-0,059)$	101,10%
Toxo16+	$(0,269-0,059)/(0,268-0,059)$	100,40%	Toxo22-	$(0,195-0,059)/(0,222-0,059)$	84%
Toxo19+	$(0,225-0,059)/(0,222-0,059)$	101,40%	Toxo23-	$(0,254-0,059)/(0,268-0,059)$	87,80%
Toxo22+	$(0,297-0,059)/(0,268-0,059)$	110,80%	Toxo31-	$(0,240-0,059)/(0,268-0,059)$	89,50%
Toxo25+	$(0,280-0,059)/(0,268-0,059)$	104,50%	Toxo32-	$(0,223-0,059)/(0,222-0,059)$	100,40%

Tabulka 4. Výpočet míry globální DNA metylace u experimentálních jedinců- 2. měření

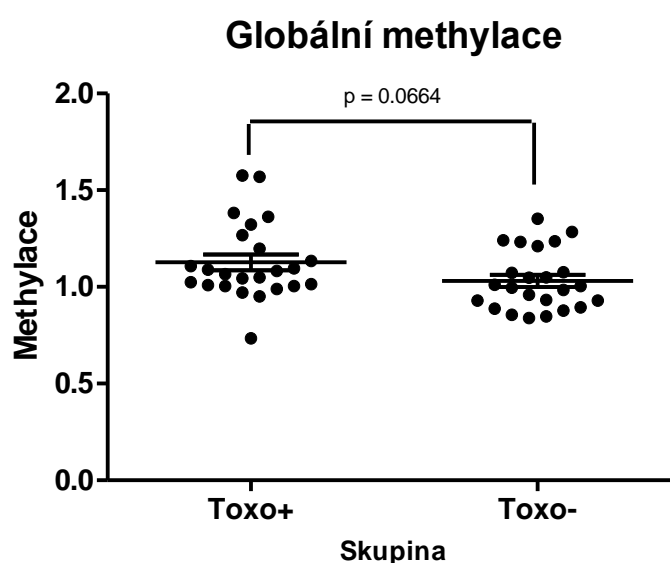


Obr. 36 Standardní křivka kontrolní metylované DNA- 3. měření

Toxo1+	(0,356-0,001)/(0,327-0,001)	108,90%	Toxo10-	(0,304-0,001)/(0,327-0,001)	92,90%
Toxo5+	(0,330-0,001)/(0,327-0,001)	100,90%	Toxo11-	(0,297-0,001)/(0,279-0,001)	107,20%
Toxo9+	(0,297-0,001)/(0,279-0,001)	106,50%	Toxo13-	(0,300-0,001)/(0,279-0,001)	107,50%
Toxo13+	(0,311-0,001)/(0,327-0,001)	95,10%	Toxo21-	(0,260-0,001)/(0,279-0,001)	93,20%
Toxo16+	(0,302-0,001)/(0,279-0,001)	108,30%	Toxo22-	(0,345-0,001)/(0,327-0,001)	105%
Toxo19+	(0,205-0,001)/(0,279-0,001)	73,40%	Toxo23-	(0,239-0,001)/(0,279-0,001)	85,60%
Toxo22+	(0,335-0,001)/(0,327-0,001)	102,50%	Toxo31-	(0,292-0,001)/(0,279-0,001)	104,70%
Toxo25+	(0,343-0,001)/(0,327-0,001)	104,90%	Toxo32-	(0,248-0,001)/(0,279-0,001)	88,80%

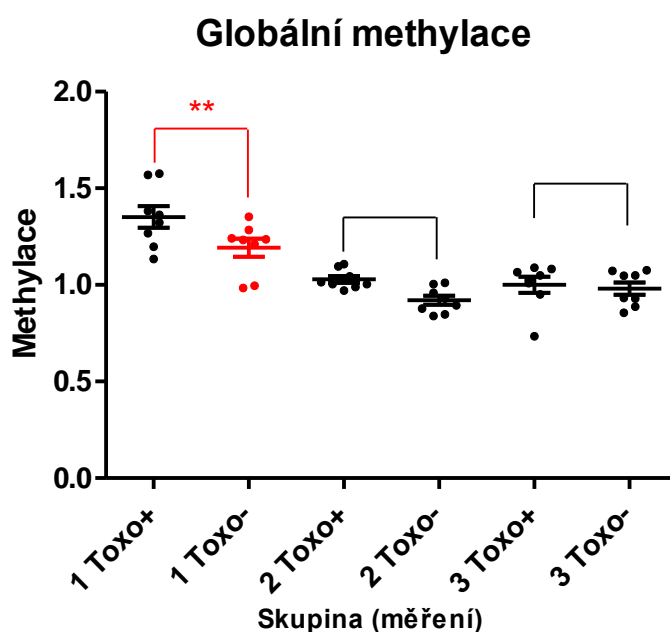
Tabulka 5. Výpočet míry globální DNA metylace u experimentálních jedinců- 3. měření

Statistické zpracování míry globální methylyace DNA je zobrazeno na grafech (Obr. 37, Obr. 38). Na grafu Obr. 37 je zobrazen rozdíl globální metylace mezi skupina ze všech 3 měření najednou, kde je vidět, že nebyl detekován signifikantní rozdíl v globální metylaci genomu mezi Toxo+ a Toxo- skupinou ($p = 0.0664$).



Obr. 37 Míra celkové globální metylace mezi skupinami. Jednotlivé body zobrazují jednotlivé naměřené hodnoty (arbitrární bezrozměrné jednotky). Středová linka zobrazuje aritmetický průměr \pm SEM. ($p=0,0664$).

Globální metylace DNA v jednotlivých měřeních (1, 2, 3) je zobrazena na grafu (Obr. 38). Signifikantní rozdíl v globální genomové methylaci mezi Toxo+ a Toxo- skupinou byl detekován v prvním měření ($p \leq 0.01$) v ostatních měřeních (2, 3) nebyly detekovány signifikantní rozdíly mezi skupinami ($p \geq 0.05$).

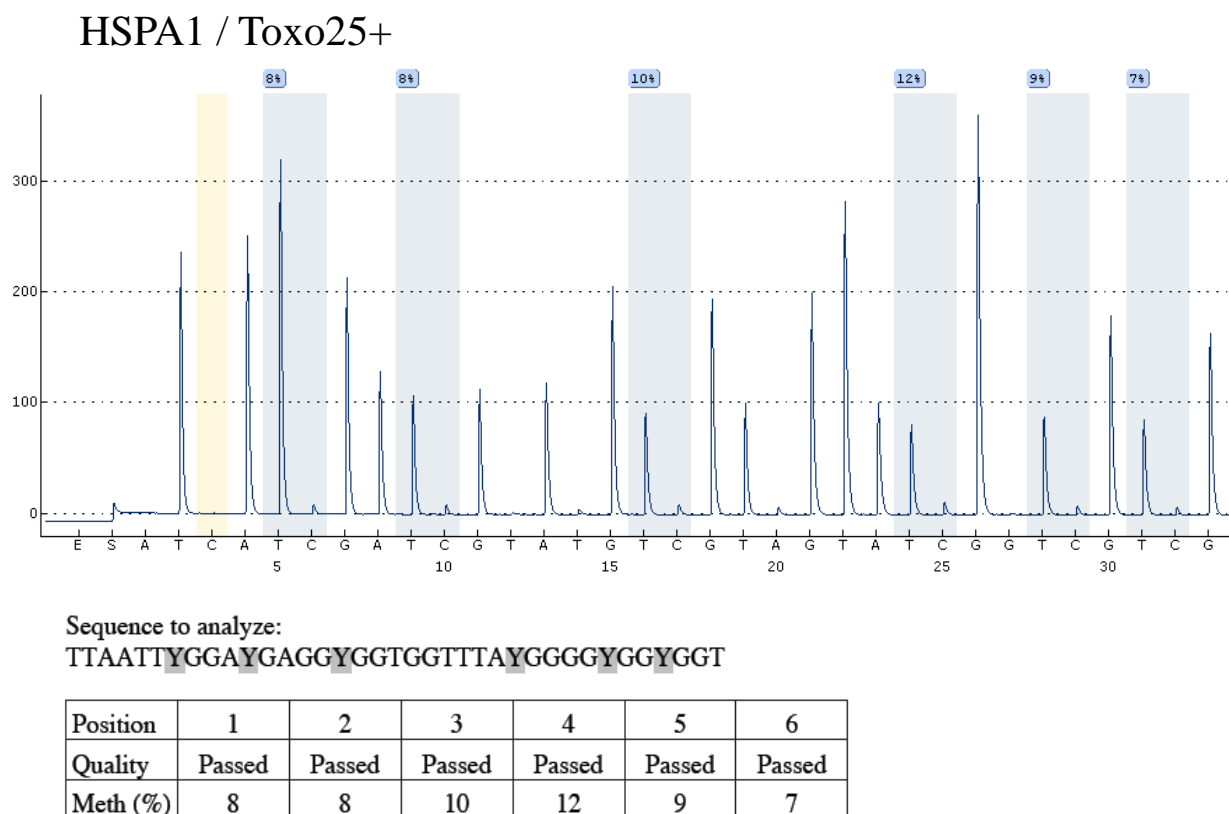


Obr. 38 Graf globální metylace v jednotlivých měřeních (1,2,3). Jednotlivé body zobrazují jednotlivé naměřené hodnoty (arbitrární bezrozměrné jednotky). Středová linka zobrazuje aritmetický průměr \pm SEM. (** $p \leq 0,01$).

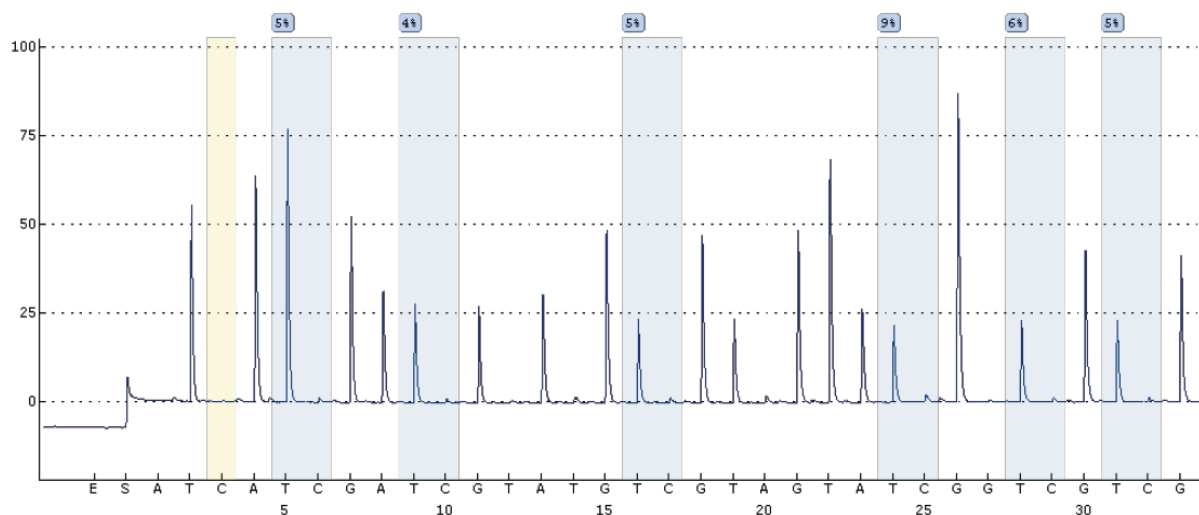
4.3.2. Analýza specifické DNA metylace genů regulujících spermatogenezi

Kvantitativní analýza specifické metylace DNA byla detekována u genů *Hspa1*, *Crem* a *Creb1*, které jsou nezbytné pro správný průběh spermatogeneze a jejichž promotory obsahují CpG dinukleotidy, tudíž je zde možnost regulace jejich exprese pomocí metylace.

Pro každý gen byl u všech jedinců stanoven pyrogram, který ukazuje míru metylace jednotlivých CpG dinukleotidů v procentech. Pod pyrogramem se nachází tabulka s analyzovanou sekvencí, kde písmeno Y představuje nukleotid cytosin, původně 5-methylcytosin. V tabulce pod sekvencí jsou shrnuta procenta metylace jednotlivých CpG pozic (1-6) (Obr. 39, Obr. 40, Obr. 41).



HSPA1 / Toxo10-



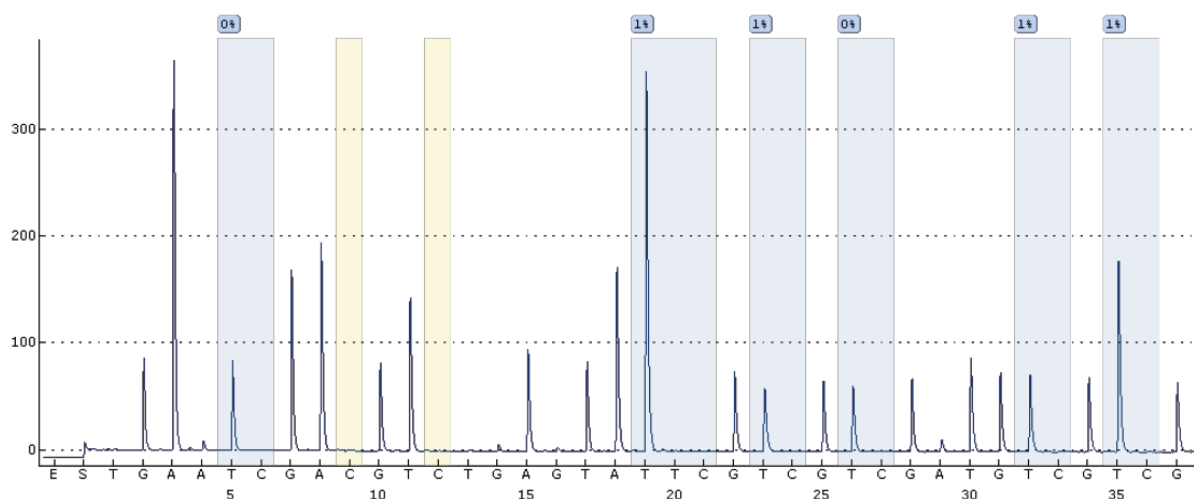
Sequence to analyze:

TTAATTGGAYGAGGYGGTGGTTTAYGGGGYGGYGGT

Position	1	2	3	4	5	6
Quality	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
Meth (%)	5	4	5	9	6	5

Obr. 39 Reprezentativní pyrogram a analyzovaná sekvence pro gen *Hspa1* pro vybraného infikovaného a kontrolního jedince.

CREM / Toxo9+

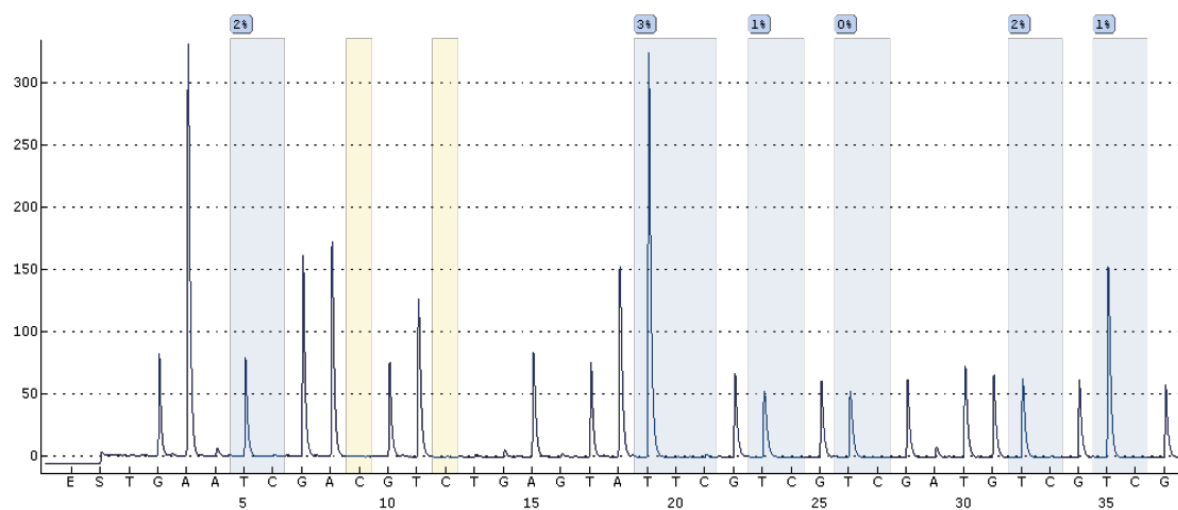


Sequence to analyze:

GAAAAA GGAAGTTATAATTTT GYG YGTGY GTTYGA

Position	1	2	3	4	5	6
Quality	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
Meth (%)	0	1	1	0	1	1

CREM/ Toxo13-



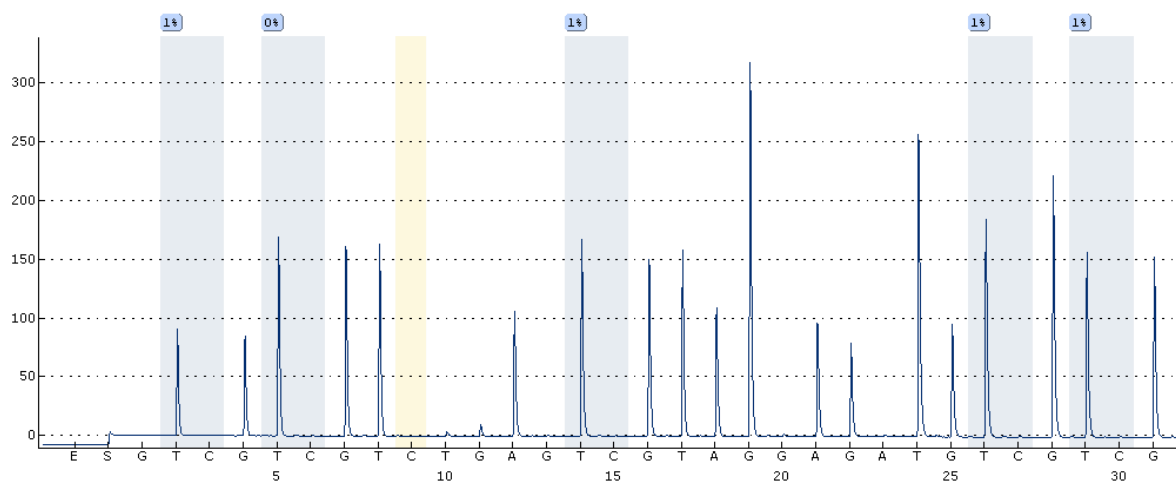
Sequence to analyze:

GAAAAA GGAAGTTATAATTTT GYG YGTGY GTTYGA

Position	1	2	3	4	5	6
Quality	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
Meth (%)	2	3	1	0	2	1

Obr. 40 Reprezentativní pyrogram a analyzovaná sekvence pro gen *Crem* u vybraného infikovaného a kontrolního jedince.

CREB1/Toxo9+

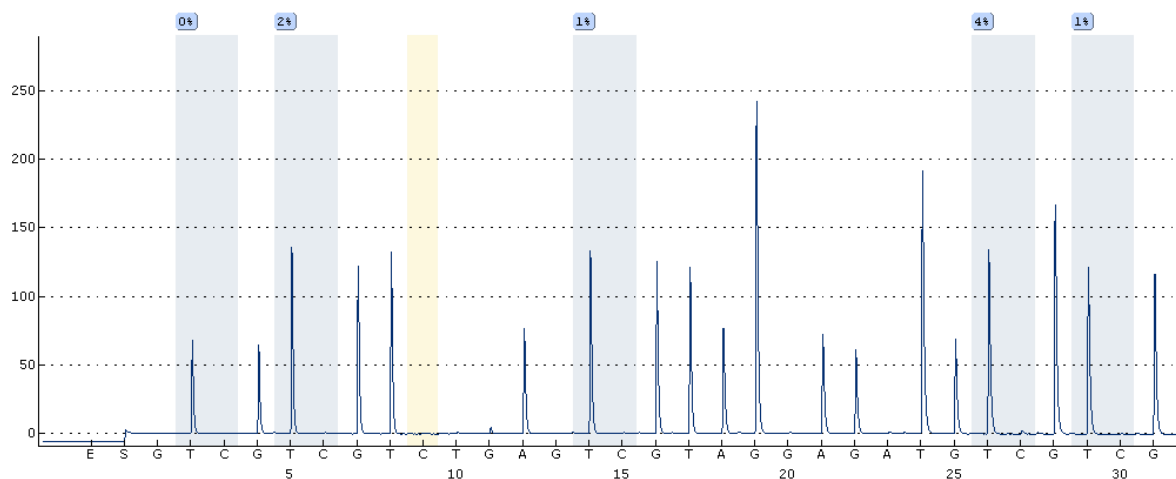


Sequence to analyze:

YGTYGGTTATYGGTTAGGGGAGTTTGTYGGGTYGGA

Position	1	2	3	4	5
Quality	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
Meth(%)	0	1	1	2	1

CREB1/Toxo10-



Sequence to analyze:

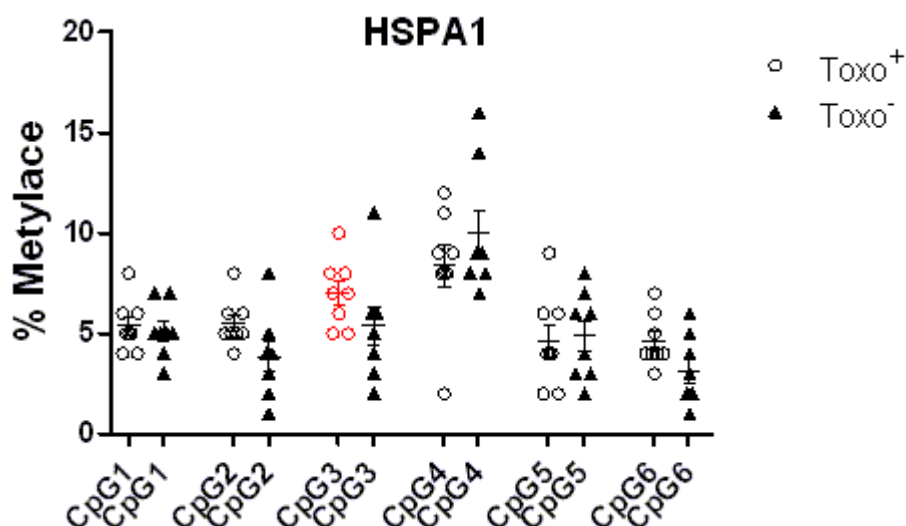
YGTYGGTTATYGGTTAGGGGAGTTTGTYGGGTYGGA

Position	1	2	3	4	5
Quality	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
Meth(%)	0	2	1	4	1

Obr. 41 Reprezentativní pyrogram a analyzovaná sekvence pro gen *Creb1* u vybraného infikovaného a kontrolního jedince.

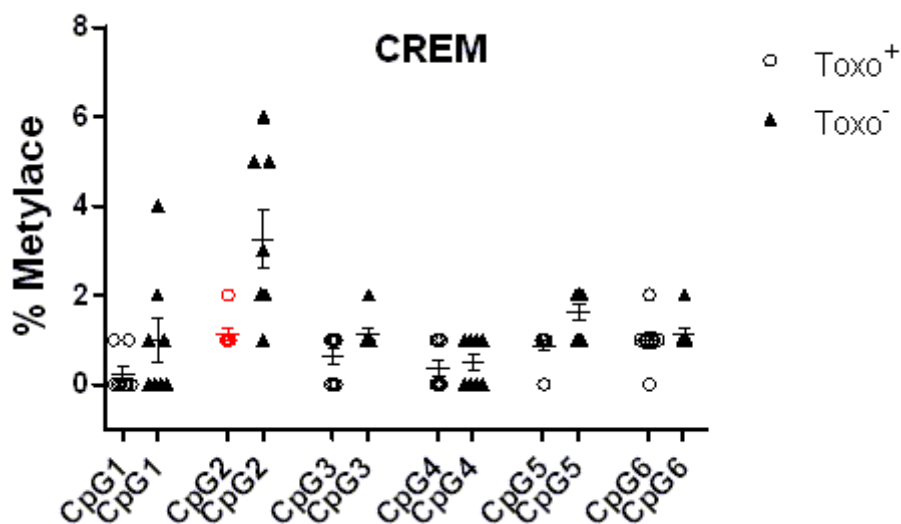
Statistické zpracování míry specifické metylace pro jednotlivé geny *Hspa1*, *Crem* a *Creb1* a jednotlivé CpG pozice je zobrazeno na grafech Obr. 42, Obr. 43 a Obr. 44.

U genu *Hspa1* byl detekován signifikantní rozdíl mezi skupina Toxo+ a Toxo- v metylaci CpG na pozici 3 ($7,29 \pm 1,60$ vs. $5,43 \pm 2,94$) (* $p \leq 0,05$). U tohoto promotoru byla detekovaná zvýšená metylace u Toxo+ skupiny oproti kontrolním jedincům. U CpG na ostatních pozicích nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi skupinami ($p \geq 0,05$) (Obr. 42).



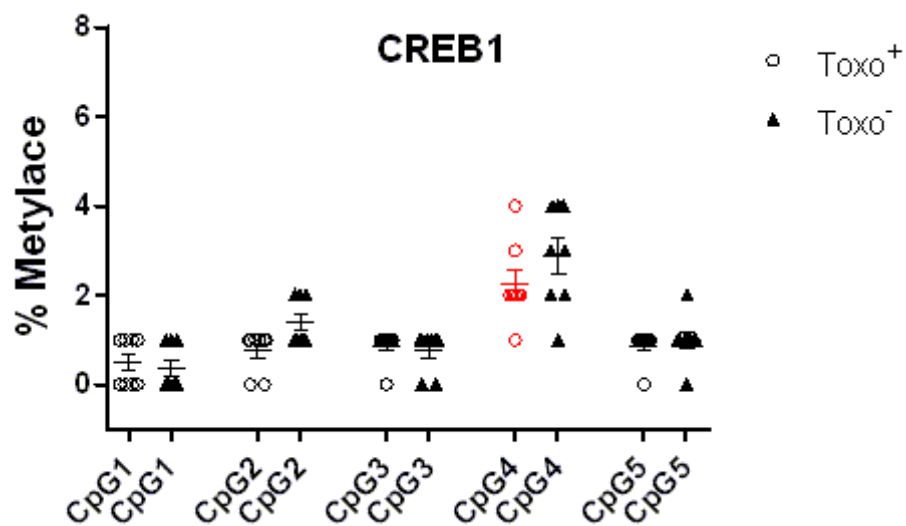
Obr. 42 Kvantitativní analýza CpG metylace promotoru *Hspa1* genu u Toxo+ a Toxo- skupiny. Středová linka zobrazuje aritmetický průměr, vnější linky zobrazují směrodatnou odchylku a body zobrazují jednotlivá měření (% metylace příslušného CpG). Červeně je zobrazen statisticky významný rozdíl (* $p \leq 0,05$).

U genu *Crem* byl detekován signifikantní rozdíl mezi skupina Toxo+ a Toxo- v metylaci CpG na pozici 2 ($1,14 \pm 0,38$ vs. $3,57 \pm 1,72$) (* $p \leq 0,05$). U tohoto promotoru byla detekovaná zvýšená metylace u Toxo- skupiny oproti Toxo+ jedincům. U CpG na ostatních pozicích nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi skupinami ($p \geq 0,05$), nicméně můžeme sledovat trend mírně zvýšené metylace u všech CpG u kontrolních jedinců oproti infikovaným kromě CpG na pozici 4 (Obr. 43).



Obr. 43 Kvantitativní analýza CpG metylace promotoru *Crem* genu u Toxo⁺ a Toxo⁻ skupiny. Středová linka zobrazuje aritmetický průměr, vnější linky zobrazují směrodatnou odchylku a body zobrazují jednotlivá měření (% metylace příslušného CpG). Červeně je zobrazen statisticky významný rozdíl (* $p \leq 0,05$).

U genu *Creb1* byl detekován signifikantní rozdíl mezi skupinami Toxo⁺ a Toxo⁻ v metylaci CpG na pozici 4 (2.25 ± 0.886 vs. 2.875 ± 1.125) (* $p \leq 0,05$). U tohoto promotoru byla detekovaná zvýšená metylace u Toxo⁻ skupiny oproti Toxo⁺ jedincům. U CpG na ostatních pozicích nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi skupinami ($p \geq 0,05$) (Obr. 44).



Obr. 44 Kvantitativní analýza CpG metylace promotoru *Creb1* genu u Toxo⁺ a Toxo⁻ skupiny. Středová linka zobrazuje aritmetický průměr, vnější linky zobrazují směrodatnou odchylku a body zobrazují jednotlivá měření (% metylace příslušného CpG). Červeně je zobrazen statisticky významný rozdíl (* $p \leq 0,05$).

5. Diskuze

U skupiny jedinců infikovaných parazitem *Toxoplasma gondii* byly oproti kontrolním jedincům zaznamenány histometrické změny reprodukčních parametrů, snížení hladiny LH hormonu v moči a změny v testikulárním epigenomu. V počátku této práce byly navrženy dvě možné hypotézy, kterými parazit *T. gondii* může změny v reprodukčních parametrech zapříčinit. Prvním možným mechanismem je aktivace HPA stresové osy, následné narušení HPG osy a změna hladiny gonadotropinů. Druhým možným mechanismem je narušení epigenetické modifikace DNA testikulární tkáně. Co se týče prvního navrhaného mechanismu, tak hladina gonadotropního hormonu LH byla opravdu v závěru akutní infekce u infikovaných jedinců signifikantně nižší oproti koncentraci před infekcí. Pro spermatogenezi je snížení hladiny tohoto gonadotropního hormonu naprosto zásadní, jelikož LH hormon je jedním z hlavních regulátorů vývoje germinálních buněk. Vzhledem k tomu, že sekrece gonadotropinů LH a FSH z hypofýzy je regulována GnRH, který je uvolňován z hypothalamu (Wistuba et al. 2007), mohou hormony stresové HPA osy, která je infekcí aktivována, způsobovat změny v hladině gonadotropinů buď snížením sekrece GnRH na úrovni hypothalamu nebo na úrovni hypofýzy snížením její citlivosti k GnRH (Rivier and Rivest 1991). Snížená koncentrace LH u jedinců Toxo+ skupiny pozitivně koreluje s výsledky histometrické analýzy a poukazuje na vážné změny v procesu spermatogeneze. Zda dochází ke snížení hladiny gonadotropinů z důvodů snížené sekrece GnRH nebo snížené citlivosti hypofýzy k GnRH, je třeba v budoucnu otestovat měřením hladiny GnRH hormonu a pro více informací o faktu interference HPA a HPG osy je třeba také detekovat hladiny hormonů HPA osy CRF, ACTH a kortikosteronů.

Lze předpokládat, že pokud u infikovaných jedinců došlo ke snížení hladiny LH hormonu, došlo také k poklesu hladiny FSH hormonu a následně i k poklesu hladiny testosteronu, vzhledem ke stejnému principu regulace sekrece LH a FSH z hypofýzy stimulací GnRH respektive k sekreci testosteronu Leydigovými buňkami v závislosti na LH stimulaci (Wistuba et al. 2007). Se změnou v hladině gonadotropinů souvisí změny detekovatelné histometrickou analýzou testikulární tkáně. V rámci analýzy testikulární tkáně došlo ke změně u parametru Sertoliho buněk, leptotenních spermatocytů, spermatid i průměru semenetvorných kanálků, což nám poskytuje celkový obraz o stavu spermatogeneze myši pod tlakem infekce. Jelikož jednotlivé parametry histometrické analýzy spolu v procesu spermatogeneze bezprostředně souvisí, mohou změny v určitém parametru přímo vysvětlovat změny v parametru jiném.

U infikovaných jedinců byl detekován zvýšený průměrný počet Sertoliho buněk na semenotvorný kanálek. Je známo, že proliferace Sertoliho buněk je omezená na dvě období života, fetální a neonatální období a období prepubertální (Walker 2003). Od puberty je populace Sertoliho buněk považována za stabilní a neměnnou, nicméně v současné době je stále více důkazů, že velikost dospělé populace Sertoliho buněk a její stav lze hormonálně modifikovat (Tarulli et al. 2012). V regulaci proliferace Sertoliho buněk jsou důležité gonadotropní hormony a hormony štítné žlázy, ale také testosteron, růstový hormon a různé parakrinní růstové faktory (Sharpe et al. 2003). Gonadotropiny mají na populaci Sertoliho buněk mitogenní účinky, ovšem kromě podpory proliferace jsou gonadotropiny zřejmě také důležité pro načasování zastavení proliferace Sertoliho buněk (Baker and O'Shaughnessy 2001). O úzké souvislosti gonadotropních hormonů s proliferací Sertoliho buněk svědčí fakt, že u myši postrádající cirkulující gonadotropiny z důvodu nedostatku GnRH proliferovaly Sertoliho buňky pomalejším tempem, ale po delší dobu (Baker and O'Shaughnessy 2001). Z výsledků tedy vyplývá, že Sertoliho buňky si zachovávají proliferační potenciál a mohou změnit svůj stav maturace v závislosti na nedostatku gonadotropních hormonů. Tyto poznatky korelují s výsledky této diplomové práce, kdy bylo detekováno snížení hladiny LH hormonu a naopak zvýšení počtu Sertoliho buněk u infikovaných jedinců. Skutečnost, že Sertoliho buňky mohou za vhodných podmínek znovu získat proliferační schopnost, ukázal Ahmed et al. (2009) v *in vitro* studiích dospělých Sertoliho buněk myši a lidí, kdy Sertoliho buňky izolované z dospělých varlat v kultuře pokračují v proliferaci při nepřítomnosti hormonální suplementace a Tarulli et al. (2006) v *in vivo* studiích Sertoliho buněk křečků.

Zvýšený počet Sertoliho buněk úzce souvisí s dalším parametrem spermatogeneze, průměrem semenotvorných kanálků. U infikovaných jedinců byl oproti kontrole detekován signifikantně zvýšený průměr kanálků. Jelikož Sertoliho buňky jsou základní konstrukční komponentou semenotvorného kanálku a jsou uspořádány po jeho obvodu (Hikim et al. 1989; Hess et al. 1993), lze usuzovat, že vyšší počet Sertoliho buněk vede k většímu průměru semenotvorného kanálků.

Oproti nárůstu počtu Sertoliho buněk byl u infikovaných jedinců detekován signifikantní pokles počtu leptotenních spermatocytů a sférických spermatid a také počtu spermatocytů na 250 Sertoliho buněk (index250). Vysvětlením sníženého počtu spermatogenních buněk u infikovaných jedinců může být zvýšená apoptóza z důvodu poklesu hladiny gonadotropinů, jelikož nejenom proliferace Sertoliho buněk, ale i proliferace a přežití germinálních buněk je ve značné míře regulováno gonadotropními hormony a testosteronem, o čemž svědčí fakt, že při chronickém snížení koncentrace těchto hormonů dochází k apoptóze

germinálních buněk, zejména ve stádiu spermatocytů, u kterého byla apoptotická smrt nejčastěji pozorována (McLachlan et al. 2002; Ruwanpura et al. 2010). O souvislosti nedostatku gonadotropních hormonů LH a FSH a snížení počtu germinálních buněk v závislosti na infekci parazitem *T. gondii* svědčí i fakt, že Yang et al. (2006) ve své studii pozoroval zvýšenou apoptózu spermatických buněk u myších samců infikovaných tímto parazitem. Je známo, že gonadotropiny a testosteron stimulují expresi několika růstových faktorů Sertoliho buněk a tak mitotické i meiotické dělení v rámci spermatogeneze závisí na obou typech těchto hormonů. Tyto hormony poskytují germinálním buňkám prostřednictvím Sertoliho buněk mitogenní signály a signály přežití (Rodriguez 2006; Shaha et al. 2010) a jejich nedostatek má za následek smrt germinálních buněk přes apoptotické dráhy (Dunkel et al. 1997). O důležitosti gonadotropního hormonu LH v regulaci přežití/apoptózy germinálních buněk svědčí poznatky Marathe et al. (1995), který ve své studii pozoroval, že specifická imunoneutralizace LH vede u potkanů k apoptóze meiotických a postmeiotických germinálních buněk. Výsledky těchto studií jsou v souladu s výsledky této DP, kdy byl pozorován pokles hladiny gonadotropinu LH a současný pokles v počtu leptotenních spermatocytů a kulatých spermatid, tedy meiotických a postmeiotických typů germinálních buněk.

Druhým navrhovaným mechanismem, kterým *T. gondii* může ovlivňovat reprodukční parametry, je změna v epigenetických modifikacích DNA buněk testikulární tkáně. Tato hypotéza byla navržena na základě poznatků nově se vyvíjejícího oboru patho-epigenetiky, která se zabývá vlivem mikrobů na epigenetickou informaci hostitele a nabízí tak nové možnosti v léčebných postupech chorob vyvolaných daným mikrobem. Vzhledem k tomu, že je v současné době známo, že některé patogeny jako jsou viry a bakterie mohou skutečně změny v epigenetické informaci hostitele způsobovat, usuzuje se, že i jiní mikroparazit a makroparazit mohou vyvolávat patologické změny v epigenetických modifikacích hostitelské DNA (Minárovits 2009), nicméně o tomto faktu je doposud jen málo informací. Tento experiment s parazitem *T. gondii* je první, který detekuje spojitost epigenetické regulace s nákazou tímto prvokem, se zjištěním, že u infikovaných jedinců ke změnám v testikulárním epigenomu opravdu došlo, konkrétně ke změně metylace DNA.

V minulosti již byla u myši a člověka prokázána asociace mezi abnormalitami v epigenetické informaci spermií a změnami ve spermatogenezi (Doerksen and Trasler 1996; Doerksen et al. 2000; Kelly et al. 2003). Defektní nastavení epigenetického vzoru v samčí germinální linii či abnormální exprese DNA-metyltransferáz jsou spojeny s nízkou kvalitou spermií a poklesem v počtu germinálních buněk, což je fakt, který prokazuje, že DNA

metylace je pro vývoj spermií rozhodující (Zhu et al. 2011). Měření úrovně DNA metylace může být v budoucnu použito jako biomarker kvality spermií, vzhledem k tomu, že pozoruhodné rozdíly v úrovni metylace DNA byly pozorovány mezi různými vzorky lidských spermií a navíc i mezi individuálně testovanými spermii jednoho vzorku (Benchai et al. 2003; Houshdaran et al. 2007; Paradowska et al. 2012).

V rámci detekce celkové míry globální metylace testikulární DNA nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi skupinou infikovaných a kontrolních jedinců, nicméně při jednotlivých měření byl u infikovaných jedinců zaznamenán trend zvýšené metylace. Signifikantní rozdíl byl zaznamenán v prvním měření, v dalších dvou měření trend zvýšené metylace u infikovaných jedinců přetrvával, ale rozdíl se snižoval a nebyl statisticky významný. Důvodem tohoto poklesu v signifikanci může být stáří vzorků, opakované rozmazování DNA a tedy zhoršená kvalita detekce a problémy s dodanými soupravami na měření. Vysvětlení nezaznamenaného rozdílu mezi skupinami při celkové detekci globální metylace může být také v souvislosti s výsledky specifické DNA metylace genů *Hspa1*, *Crem* a *Creb1*. U genu *Hspa1* byla u infikovaných jedinců detekována zvýšená metylace oproti kontrolním jedincům, ovšem u genu *Crem* a *Creb1* byly výsledky opačné. Z globálního hlediska tedy může zvýšená metylace jedněch genů vyrovnat sníženou metylaci genů druhých a poměry metylace testikulární tkáně tak mohou být mezi skupinami vyrovnané.

Mechanismus, kterým *T. gondii* ovlivňuje metylaci testikulární DNA, není dosud znám. Brunet et al. (2008) poukázal na fakt, že ligáza UHRF1 (Ubiquitin-like s PHD a ring finger doménou1), která hraje zásadní roli v přenosu metylačního vzoru z mateřské buňky na buňky dceřinné (Bostick et al. 2007), je zásadní také v zastavení buněčného cyklu hostitelské buňky v *T. gondii* infikovaných buňkách v G2 fázi pro podporu replikace parazita. UHRF1 přivádí DNMT1 do blízkosti hostitelské DNA a umožňuje tak metylaci obou DNA. Kromě toho, že UHRF1 ovlivňuje epigenetické modifikace jako je metylace DNA, metylace histonů a remodelace chromatinu, může být také využita *T. gondii* k ovládnutí hostitelské epigenetické mašinerie (Leng et al. 2009; Unoki et al. 2009). Vzhledem k tomu, že UHRF1 ovlivňuje DNA metylaci, může aberantní overexprese UHRF1 způsobovat hypermetylaci DNA testikulární tkáně a proto je v budoucích studiích třeba ověřit tuto teorii detekcí míry exprese UHRF1.

Na specifické úrovni vybraných, pro spermatogenezi klíčových, *Hspa1*, *Crem* a *Creb1* genů, které podléhají epigenetické regulaci, byl detekován signifikantní rozdíl v DNA metylaci mezi Toxo+ a Toxo- skupinou.

Spermatogeneze je vysoce specializovaný proces mitotického a meiotického dělení, který vede k tvorbě haploidních samčích pohlavních buněk a speciální tvar a funkci získávají zárodečné buňky během posledních kroků spermiogeneze závislých na expresi specifických genů, které nejsou v jiných buněčných typech aktivovány (Wistuba et al. 2007). Mezi tyto geny patří *Hspa1*, který kóduje testes specifický heat shock cognate protein HSC70t. U infikovaných jedinců byl zaznamenán statisticky významný nárůst metylace CpG dinukleotidů na 3. pozici oproti kontrole. HSC70t protein je členem rodiny HSP70 proteinů (heat shock proteiny- Hsps) a u myši je konstitutivně exprimován ve spermatogenních buňkách po meiotickém dělení (Tsunekawa et al. 1999). Hsps70 proteiny jsou v buňce syntetizovány závisle na stresových podmínkách, zatímco blízko příbuzné proteiny, které se nazývají „cognates“ jsou syntetizovány konstitutivně, bez působení stresu a hrají také významnou roli v regulaci buněčného cyklu a embryonálního vývoje (Bensaude et al. 1983; Iida and Yahara 1984; Lowe and Moran 1984). HSC70t mRNA se poprvé objevuje po meióze v haploidních buňkách, ale není efektivně translatována do té doby, než tyto buňky projdou do transkripčně inaktivního stádia, které je spojeno s kondenzací chromatinu, tudíž transkripce a translace HSC70t jsou časově odděleny (Tsunekawa et al. 1999). Protein HSC70t se poprvé objevuje v cytoplazmě pozdních spermatid (Tsunekawa et al. 1999) a jeho exprese je důležitá pro tvorbu a funkci proteinových komplexů, které jsou zapojeny do produkce energie ve formě ATP a je tak nezbytný pro správnou pohyblivost spermií, jelikož při defektní expresi tohoto proteinu se spermie stávají dříve imotilní (Eddy 2002). Zvýšená metylace *Hspa1* genu, která je pravděpodobně spojená se sníženou expresí proteinu HSC70t, se může podílet na snížení motility spermií, tedy defektu spermatogeneze, který byl pozorován u potkaních samců (Terpsidis et al. 2009) a u mužů (Zhou et al. 2003) infikovaných parazitem *T. gondii*.

U genu *Crem* a *Creb1* byl detekován statisticky významný pokles metylace na jedné pozici CpG u Toxo+ pozitivní skupiny oproti kontrolním jedincům, u *Crem* na pozici 2. a u *Creb1* na pozici 4. CREM a CREB proteiny jsou transkripční faktory uplatňujících se v cAMP-závislé signální dráze, která představuje jeden z molekulárních mechanismů hrající důležitou roli v regulaci exprese mnoha specifických genů spermatogeneze, přičemž oba specificky váží tzv. CRE element (cAMP-response element) v promotoru cílových genů (Don and Stelzer 2002). V testikulární tkáni lze alternativním sestřihem vytvářet represory a aktivátory transkripce CREM, přičemž transkripční aktivátory jsou vysoce exprimovány v post-meiotických haploidních germinálních buňkách (Foulkes et al. 1992; Delmas et al. 1993) a jsou nezbytné pro morfologickou a funkční maturaci spermatid (Nantel et al. 1996). O důležitosti CREM proteinu ve spermatogenezi svědčí výsledky lidských studií, kde u mužů s

poruchou spermatogeneze a zastavením maturace spermatid byla pozorována abnormální exprese CREM a modifikovaný sestřih RNA transkriptů (Weinbauer et al. 1998; Steger et al. 1999).

V Sertoliho buňkách hladina CREB kolísá cyklickým způsobem, který závisí na specifické asociaci buněk během spermatogenní vlny (Waeber et al. 1991), kde po aktivaci c-AMP signální dráhy FSH hormonem CREB pozitivně auto-reguluje svoji expresi (vazbou na CRE ve svém promotoru) a aktivní CREB poté aktivuje transkripci genů nezbytných pro diferenciaci germinálních buněk (Walker et al. 1995). Tento fakt ukazuje na spojitost exprese genů důležitých pro správnou tvorbu germinálních buněk a hladinou gonadotropinu FSH přes c-AMP signální dráhu. Navíc je tato dráha zapojena i v tvorbě LH horomu, která závisí na aktivaci CBP (CREB-binding protein) pomocí GnRH (Miller et al. 2012). Lze tedy usuzovat, že při změně hladiny gonadotropinů dochází k narušení cAMP signální dráhy a narušení spermatogeneze, vzhledem k tomu, že aktivovaný CREB následně aktivuje indukibilní cAMP časný represor (ICER), supresorovou formu CREM, který down-reguluje CREB expresi a tak resetuje CREB na bazální úroveň, která umožňuje novou vlnu spermatogeneze (Monaco et al. 1995, Walker et al. 1998). V regulaci exprese CREB v Sertoliho buňkách navíc hrají roli i samy germinální buňky, konkrétně kulaté spermatidy, které vylučují TNF α aktivující NF- κ B závislou expresi CREB a tím přispívají ke zvýšení hladiny CREB do té doby dokud jsou spermatidy se Sertoliho buňkami úzce spojeny (De et al. 1993, Delfino and Walker 1998). Geny *Crem* a *Creb1* byly tedy vybrány mimo jiné i z důvodu odpovědi na změny v hladině gonadotropinů a schopnosti autoregulace CREB/CREM systému přes stimulaci cAMP signální dráhy hladinou FSH, tudíž snížená metylace CREM u infikovaných jedinců může souviset se snížením hladiny gonadotropinů a tedy s narušením cAMP signální dráhy, následně s poruchou autoregulace CREB a narušením spermatogeneze. Navíc správný vývoj spermatid je závislý na expresi CREB, potažmo CREM, v Sertoliho buňkách. Tato exprese je závislá na kontaktu Sertoliho buněk a vývíjejících se spermatid a pokud tato komunikace funguje, probíhá maturace kulatých spermatid a dochází k jejich elongaci. Tento fakt ukazuje i na souvislost s morfologickou analýzou, kdy diferenciaci germinálních buněk závisí na přímém kontaktu se Sertoliho buňkami a narušení této komunikace vede k defektům ve vývoji germinálních buněk

Vzhledem k tomu, že během spermatogeneze dochází v germinálních i somatických buňkách varlete k cyklické expresi CREM a CREB proteinů závisle na výkyvech cAMP signalizace vyvolaných LH a FSH hormony, jak v průběhu pohlavního dozrávání varlat, tak během 12-denního, ke kterému dochází ve varlatech dospělého jedince (Waeber et al. 1991;

Foulkes et al. 1993), může detekovaný pokles hladiny LH u Toxo+ pozitivní skupiny vést k narušení exprese CREM a CREB přes modifikovanou cAMP signalizaci. Je však také možné, že epigeneticky modifikovaná exprese genů CREM a/nebo CREB, může vést k abnormální transkripci proteinů, jejíž následkem může být modifikování signálních drah, včetně dráhy gonadotropinů.

Snížená úroveň spermatogeneze a snížená pohyblivost a kvalita spermií byly zaznamenány v korelaci s abnormální metylací *Crem* genu (Nanassy and Carrell 2011). Kromě toho bylo prokázáno, že přežití zárodečných buněk je závislé na faktoru, který je produkován Sertoliho buňkami v závislosti na CREB proteinu (Scobey et al. 2001) a také byla u myši pozorována zvýšená apoptóza meiotických a postmeiotických zárodečných buněk v případě deficience *Creb3l4* (Adham et al. 2005)

Z důvodu zvýšení metylace *Hspal* genu a snížení metylace *Crem* a *Creb1* genů lze předpokládat snížená respektive zvýšená exprese proteinů. Co se týče CREB a CREM proteinů, zůstává otázkou zda defektním stavem, který vede k narušení procesu spermatogeneze a maturace spermatid může být také snížená metylace a následně zvýšená exprese proteinů. V budoucnu by tedy bylo vhodné zaměřit se na detekci hladiny mRNA i proteinů *Crem*, *Creb* i *Hspal* genů a vzhledem k expresi CREM a CREB transkripčních represorů či transkripčních aktivátorů v závislosti na stádiu germinálních buněk by bylo vhodné provést detekci globální i specifické metylace DNA u jednotlivých buněčných populací testikulární tkáně a z důvodů souvislosti metylace *Crem* genu a protaminace DNA spermií, by bylo vhodné také provést detekci poměru protaminů spermií experimentálních jedinců.

6. Závěr

Komunikace mezi somatickými a samčími zárodečnými buňkami je zásadní pro jejich proliferaci, diferenciaci a zrání a regulace těchto procesů se děje na několika úrovních, včetně úrovně hormonální a epigenetické. Jakékoli narušení tohoto systému se odráží v abnormálním stavu morfologie testikulární tkáně či reprodukčních schopnostech.

V experimentu s parazitem *Toxoplasma gondii* byly u infikovaných myších samců zaznamenány změny v rámci histometrické analýzy i v rámci analýzy testikulárního epigenomu. Vzhledem k tomu, že toto jsou parametry, které jsou úzce spojeny s celkovou reprodukční fitness jedince, dá se usuzovat, že po infekci jedince parazitem *T.gondii* dochází ke snížení reprodukčního potenciálu.

Získané výsledky studia reprodukčních parametrů samců myší na úrovni morfologické, hormonální a epigenetické byly zaznamenány pouze v průběhu akutní fáze infekce parazitem *T. gondii*, která přetrvává zhruba 30 dní od začátku infekce. Zda jsou tyto změny v reprodukčních parametrech trvalé či jsou projevem pouze akutní fáze, je třeba zjistit experimentem zaměřeným na studium daných parametrů v následující chronické fázi infekce. Rovněž, zda se jedná o jeden z univerzálních mechanismů působení tohoto parazita na svého hostitele platný i pro ostatní savce, včetně člověka, by mělo být otázkou dalšího výzkumu.

Publikace v přípravě:

***Toxoplasma gondii* decreases reproductive fitness in mice**

Kateřina Dvořáková-Hortová¹, Adéla Šidlová¹, Lukáš Děd², Denisa Hladovcová¹, Markus Vieweg³, Wolfgang Weidner³, Klaus Steger³, Pavel Stopka¹ & Agnieszka Paradowska-Dogan^{3*}

¹ Biocev group, Department of Zoology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Vinicna 7, Prague 2, 128 44, Czech Republic,

² Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Biotechnology AS CR, v. v. i., Videnska 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic

³ Department of Urology, Pediatric Urology and Andrology, Justus Liebig University of Giessen, Schubertstrasse 81, Giessen, 35392, Germany

Literatura

Adham IM, Eck TJ, Mierau K, Müller N, Sallam MA, Paprotta I, Schubert S, Hoyer-Fender S and Engel W. Reduction of spermatogenesis but not fertility in Creb3l4-deficient mice 2005; Mol Cell Biol. 25(17):7657-64.

Ahmed EA, Barten-van Rijbroek AD, Kal HB, Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, van Pelt AM, de Rooij DG. Proliferative activity in vitro and DNA repair indicate that adult mouse and human Sertoli cells are not terminally differentiated, quiescent cells 2009; Biol Reprod. 80(6):1084-91.

Aliberti J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii* 2005; Nature Reviews Immunology 5, 162-170

Amann RP and Berndtson WE. Assessment of procedures for screening agents for effects on male reproduction: Effect of dibromochloropropane (DBCP) on the rat 1986. Fundamental and applied toxicology 7, 244-255

Angrisano T, Pero R, Peluso S, Keller S, Sacchetti S, Bruni CB, Chiariotti L and Lembo F. LPS-induced IL-8 activation in human intestinal epithelial cells is accompanied by specific histone H3 acetylation and methylation changes 2010; BMC Microbiology 10:172

Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, Liu L, Mullen JB, Carrell DT. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm 2005; J Androl. 26(6):741-8.

Aoki VW, Liu L, Carrell DT. Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males 2005; Hum Reprod. 1298-306.

Araujo FG. Depletion of L3T4+ (CD4+) T lymphocytes prevents development of resistance to *Toxoplasma gondii* in mice 1991; Infect Immun.59(5):1614-9

Ariel M, Cedar H and McCarrey J. Developmental changes in methylation of spermatogenesis-specific genes include reprogramming in the epididymis 1994; Nat Genet. 7(1):59-63.

Asano Y, Akiyama K, Tsuji T, Takahashi S, Noguchi J and Kunieda T. Characterization and linkage mapping of an ENU-induced mutant mouse with defective spermatogenesis 2009; Exp. Anim. 58 (5), 525-532

Baker PJ and O'Shaughnessy PJ. Role of gonadotrophins in regulating numbers of Leydig and Sertoli cells during fetal and postnatal development in mice 2001; Reproduction 122, 227-234

Bambino TH and Hsueh AJ. Direct inhibitory effect of glucocorticoids upon testicular luteinizing hormone receptor and steroidogenesis in vivo and in vitro 1981; Endocrinology 108(6):2142-8

Behr R and Weinbauer GF. cAMP response element modulator (CREM): an essential factor for spermatogenesis in primates? 2001; Int J Androl. 24(3):126-35.

- Benchab M, Ajina M, Lornage J, Niveleau A, Durand P and Guerin JC. Quantitation by image analysis of global DNA methylation in human spermatozoa and its prognostic value in in vitro fertilization: a preliminary study 2003; *Fertility and Sterility* VOL. 80, NO. 4,
- Berndtson WE, Neefus C, Foote RH and Amann RP. Optimal replication for histometric analyses of testicular function in rats or rabbits 1989. *Fundamental and applied toxicology* 12, 291-302
- Bensaude O, Babinet C, Morange M and Jacob F. Heat shock proteins, first major products of zygotic gene activity in mouse embryo 1983; *Nature* 22-28;305(5932):331-3
- Bettgowda A and Wilkinson MF Transcription and post-transcriptional regulation of spermatogenesis 2010; *Phil. Trans. R. Soc. B* 365, 1637–1651
- Blader IJ and Saeij JP. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion and virulence 2009; *APMIS* 117:458-476
- Blendy JA, Kaestner KH, Weinbauer GF, Nieschlag E, Schütz G. Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the CREM gene 1996; *Nature* 14;380(6570):162-5.
- Bostick M, Kim JK, Estève PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE. UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells 2007; *Science*. 317(5845):1760-4.
- Bourc'his D and Bestor TH. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L 2004; *Nature*. 431(7004):96-9.
- Brunet J, Pfaff AW, Abidi A, Unoki M, Nakamura Y, Guinard M, Klein JP, Candolfi E, Mousli M. *Toxoplasma gondii* exploits UHRF1 and induces host cell cycle arrest at G2 to enable its proliferation 2008; *Cell Microbiol.* 10(4):908-20
- Cavallotti C, Mione MC, Napoleone P and Amenta F. Protocol for improving the morphology of frozen sections of nervous and muscular tissue 1984; *The Italian Journal Of Neurological Sciences* Volume 5, Number 1
- Cisneros FJ. DNA methylation and male infertility 2004; *Frontiers in Bioscience* 9, 1189-1200
- Crépieux P, Marion S, Martinat N, Fafeur V, Vern YL, Kerboeuf D, Guillou F, Reiter E. The ERK-dependent signalling is stage-specifically modulated by FSH, during primary Sertoli cell maturation 2001; *Oncogene*. 20(34):4696-709.
- Creusot F, Acs G and Christman JK. Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine 1982; *J Biol Chem*. 257(4):2041-8.
- Daniel PB, Rohrbach L, Habener JF. Novel cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) response element modulator theta isoforms expressed by two newly identified cAMP-responsive promoters active in the testis 2000; *Endocrinology* 141(11):3923-30.
- Davis TL, Yang GJ, McCarrey JR and Bartolomei MS. The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development 2000; *Hum Mol Genet.*9(19):2885-94.

- De Cesare D, Fimia GM, Sassone-Corsi P. Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation 1999; Trends Biochem Sci. 24(7):281-5.
- de Groot RP, de Hertog J, Vandenheede JR, Goris J, Sassone-Corsi P. Multiple and cooperative phosphorylation events regulate the CREM activator function 1993; EMBO J. (10):3903-11.
- De SK, Chen HL, Pace JL, Hunt JS, Terranova PF and Enders GC. Expression of tumor necrosis factor- α in mouse spermatogenic cells 1993. Endocrinology, 133(1):389-96.
- Delfino F and Walker WH. Stage-specific nuclear expression of NF- κ B in mammalian testis 1998. Mol Endocrinol. 12(11):1696-707.
- Delitala G, Devilla L and Arata L. Opiate receptors and anterior pituitary hormone secretion in man. Effect of naloxone infusion 1981; Acta Endocrinol (Copenh). 97(2):150-6
- Delmas V, van der Hoorn F, Mellström B, Jégou B and Sassone-Corsi P. Induction of CREM activator proteins in spermatids: down-stream targets and implications for haploid germ cell differentiation 1993; Mol Endocrinol. 7(11):1502-14.
- Derouin F and Garin YJ. Toxoplasma gondii: blood and tissue kinetics during acute and chronic infections in mice 1991; Exp Parasitol. 73(4):460-8.
- Doerksen T and Trasler JM. Developmental exposure of male germ cells to 5-azacytidine results in abnormal preimplantation development in rats 1996; Biol Reprod. 55(5):1155-62
- Doerksen T, Benoit G and Trasler JM. Deoxyribonucleic acid hypomethylation of male germ cells by mitotic and meiotic exposure to 5-azacytidine is associated with altered testicular histology 2000; Endocrinology. 141(9):3235-44.
- Don J and Stelzer G. The expanding family of CREB/CREM transcription factors that are involved with spermatogenesis 2002; Mol Cell Endocrinol. 2002 Feb 22;187(1-2):115-24.
- Douglas LR, Nancy JR and Barry JD. A Cryoprotection method that facilitates cutting frozen sections of whole monkey brains for histological and histochemical processing without freezing artifact 1986; Journal of Histochemistry and Cytochemistry Vol. 34, No. 10, pp. 1301-1315
- Dubey JP. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of Toxoplasma gondii 1997; J Eukaryot Microbiol.;44(6):592-602
- Dubey JP. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis 2004; Vet Parasitol; 126:57-72
- Dunkel L, Hirvonen V and Erkkil K. Clinical aspects of male germ cell apoptosis during testis development and spermatogenesis 1997; Cell Death and Differentiation 4, 171 \pm 179
- Dzierszinski FS and Hunter CA. Advances in the use of genetically engineered parasites to study immunity to Toxoplasma gondii 2008; Parasite Immunol. 30(4):235-44

- Eblen A, Bao S, Lei ZM, Nakajima ST and Rao CV. The presence of functional luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in human sperm 2001; J Clin Endocrinol Metab. 86(6):2643-8
- Eddy EM. Male germ cell gene expression 2002; The Endocrine Society
- Fayer R. Toxoplasmosis update and public health implications 1981; Can. vet. J. 22: 344-352
- Feustel SM, Meissner M and Liesenfeld O. Toxoplasma gondii and the blood-brain barrier 2012; Virulence 3:2, 1–11; March/April
- Fimia GM, De Cesare D, Sassone-Corsi P. CBP-independent activation of CREM and CREB by the LIM-only protein ACT 1999; Nature 11;398(6723):165-9
- Fimia GM, De Cesare D, Sassone-Corsi P. A family of LIM-only transcriptional coactivators: tissue specific expression and selective activation of CREB and CREM 2000; Mol Cell Biol. 20(22):8613-22.
- Fix C, Jordan C, Cano P, Walker WH. Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells 2004; Proc Natl Acad Sci U S A. 101(30):10919-24.
- Flanagan JM, Pependikyte V, Pozdniakovaite N, Sobolev M, Assadzadeh A, Schumacher A, Zangeneh M, Lau L, Virtanen C, Wang SC and Petronis A. Intra- and interindividual epigenetic variation in human germ cells 2006; Am J Hum Genet. 79(1):67-84
- Flegr J, Zitková S, Kodým P and Frynta D. Induction of changes in human behaviour by the parasitic protozoan Toxoplasma gondii 1996; Parasitology 113 (Pt 1):49-54
- Foulkes NS, Borrelli E and Sassone-Corsi P. CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription 1991; Cell 64(4):739-49
- Foulkes NS, Mellstrom B, Benusiglio E and Sassone-Corsi P. Developmental switch of CREM function during spermatogenesis: from antagonist to activator 1992; Nature 355, 80 – 84
- Foulkes NS, Schlotter F, Pévet P and Sassone-Corsi P. Pituitary hormone FSH directs the CREM functional switch during spermatogenesis 1993; Nature 18;362(6417):264-7.
- Gabbara S and Bhagwat AS. The mechanism of inhibition of DNA (cytosine-5)-methyltransferases by 5-azacytosine is likely to involve methyl transfer to the inhibitor 1995; Biochem J. 307 (Pt 1):87-92.
- Ge R, Chen G and Hardy MP. The role of the Leydig cell in spermatogenic function 2009; Advances in Experimental Medicine and Biology, Volume 636, 255-269
- Gindoff PR and Ferin M. Endogenous opioid peptides modulate the effect of corticotropin-releasing factor on gonadotropin release in the primate 1987; Endocrinology. 121(3):837-42
- Girardet C, Walker WH and Habener JF. An alternatively spliced polycistronic mRNA encoding cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-responsive transcription factor

CREB (cAMP response element-binding protein) in human testis extinguishes expression of an internally translated inhibitor CREB isoform 1996; *Molecular Endocrinology* vol. 10 no. 7 879-891

Gonzalez GA, Menzel P, Leonard J, Fischer WH, Montminy MR. Characterization of motifs which are critical for activity of the cyclic AMP-responsive transcription factor CREB 1991; *Mol Cell Biol* 11(3):1306-12.

Gorczyńska E, Spaliviero J, Handelsman DJ. The relationship between 3',5'-cyclic adenosine monophosphate and calcium in mediating follicle-stimulating hormone signal transduction in Sertoli cells 1994; *Endocrinology* 134(1):293-300.

Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis 1998; *Semin Cell Dev Biol.* 9(4):411-6.

Guerif F, Cadoret V, Rahal-Perola V, Lansac J, Bernex F, Panthier JJ, Hochereau-de Reviers MT, Royere D. Apoptosis, onset and maintenance of spermatogenesis: evidence for the involvement of Kit in Kit-haplodeficient mice 2002; *Biol Reprod.* 67(1):70-9.

Heckert LL and Griswold MD. The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis 2002; *Recent Prog Horm Res.* 57:129-48

Hess RA, Cooke PS, Bunick D and Kirby JD. Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli and germ cell numbers 1993; *Endocrinology* vol. 132 no. 6 2607-2613

Hikim AP, Amador AG, Klemcke HG, Bartke A and Russell LD. Correlative morphology and endocrinology of Sertoli cells in Hamster testes in active and inactive states spermatogenesis 1989; *Endocrinology* vol. 125 no. 4 1829-1843

Hill D and Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention 2002; *Clin Microbiol Infect*; 8: 634–640

Hoeffler JP, Meyer TE, Yun Y, Jameson JL and Habener JF. Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA 1988; *Science* 242(4884):1430-3

Holdcraft RW and Braun RE. Hormonal regulation of spermatogenesis 2004. *International journal of andrology*, 27:335–342

Houshdaran S, Cortessis VK, Siegmund K, Yang A, Laird PW, Sokol RZ. Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad DNA methylation erasure defect in abnormal human sperm 2007; *PLoS ONE* 2(12)

Huang YX and Sha JH. Proteomics of spermatogenesis: from protein lists to understanding the regulation of male fertility and infertility 2011; *Asian Journal of Andrology* 13, 18–23

Huleihel M, Lunenfeld E. Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors 2004; *Asian J Androl.*6(3):259-68.

Cheng J, Watkins SC, Walker WH. Testosterone activates mitogen-activated protein kinase via Src kinase and the epidermal growth factor receptor in sertoli cells 2007; *Endocrinology* 148(5):2066-74.

Christman JK, Mendelsohn N, Herzog D and Schneiderman N. Effect of 5-azacytidine on differentiation and DNA methylation in human promyelocytic leukemia cells (HL-60) 1983; *Cancer Res.*;43(2):763-9

Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP 1993; *Nature* 365(6449):855-9.

Iordanov M, Bender K, Ade T, Schmid W, Sachsenmaier C, Engel K, Gaestel M, Rahmsdorf HJ, Herrlich P. CREB is activated by UVC through a p38/HOG-1-dependent protein kinase 1997; *EMBO J.* 16(5):1009-22.

Iida H and Yahara I. Durable synthesis of high molecular weight heat shock proteins in *Go* cells of the yeast and other eucaryotes 1984; *The Journal of cell biolog* volume 99 199-207

Jamsai D and O'Bryan MK. Mouse models in male fertility research 2011; *Asian Journal of Andrology* 13, 139–151

Kafri T, Ariel M, Brandeis M, Shemer R, Urven L, McCarrey J, Cedar H and Razin A. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line 1992; *Genes Dev.* 6(5):705-14.

Kelly TL, Li E and Trasler JM. 5-aza-2'-deoxycytidine induces alterations in murine spermatogenesis and pregnancy outcome 2003; *J Androl.* 24(6):822-30

Kim JS, Song MS, Seo HS, Yang M, Kim SH, Kim JC, Kim H, Saito TR, Shin T, Moon C. Immunohistochemical analysis of cAMP response element-binding protein in mouse testis during postnatal development and spermatogenesis 2009; *Histochem Cell Biol.*131(4):501-7

Kobayashi H, Sato A, Otsu E, Hiura H, Tomatsu C, Utsunomiya T, Sasaki H, Yaegashi N and Arima T. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients 2007; *Hum Mol Genet.* 16(21):2542-51.

Kotaja N, De Cesare D, Macho B, Monaco L, Brancorsini S, Goossens E, Tournaye H, Gansmuller A and Sassone-Corsi P. Abnormal sperm in mice with targeted deletion of the act (activator of cAMP-responsive element modulator in testis) gene 2004; *PNAS* vol. 101, no. 29

Kotaja N, Macho B and Sassone-Corsi P. Microtubule-independent and Protein Kinase A-mediated Function of Kinesin KIF17b Controls the Intracellular Transport of Activator of CREM in Testis (ACT) 2005; *The Journal of biology and chemistry* Vol. 280, No. 36

Kwok RP, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bächinger HP, Brennan RG, Roberts SG, Green MR, Goodman RH. Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB 1994; *Nature.* 370(6486):223-6.

Lambert H and Barragan A. Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii* 2010; *cellular Microbiology* 12(3), 292–300

Lees-Murdock DJ, De Felici M and Walsh CP. Methylation dynamics of repetitive DNA elements in the mouse germ cell lineage 2003; *Genomics.* 82(2):230-7.

Leng J, Butcher BA, Egan CE, Abdallah DS and Denkers EY. Toxoplasma gondii prevents chromatin remodeling initiated by TLR-triggered macrophage activation 2009; J Immunol 182:489–97

Levy BH and Tasker JG. Synaptic regulation of the hypothalamic–pituitary adrenal axis and its modulation by glucocorticoids and stress 2012; Frontiers in Cellular Neuroscience Volume6 Article 24

Lönnerberg P, Parvinen M, Jahnsen T, Hansson V, Persson H. Stage- and cell-specific expression of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate dependent protein kinases in rat seminiferous epithelium 1992; Biol Reprod. 46(6):1057-68

Lowe DG and Moran LA. Proteins related to the mouse L-cell major heat shock protein are synthesized in the absence of heat shock gene expression 1984; Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 81, pp. 2317-2321

Macho B, Brancorsini S, Fimia GM, Setou M, Hirokawa N, Sassone-Corsi P. CREM-dependent transcription in male germ cells controlled by a kinesin 2002; Science 298 (5602):2388-90

Mann DR and Wilson ME. Hormonal changes in the plasma and testicular interstitial fluid during restraint stress 1988. Proc Int Congress Anim Reprod & Art Insem11 (Vol 2): 43.

Marathe CK, Shetty J and Dighe RR. Selective immunoneutralization of luteinizing hormone results in the apoptotic cell death of pachytene spermatocytes and spermatids in the rat testis 1995; Endocrine. 3(10):705-9

Marques CJ, Costa P, Vaz B, Carvalho F, Fernandes S, Barros A, and Sousa M. Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia 2008; Mol Hum Reprod. 14(2):67-74

Marić D, Kostić T and Kovacević R. Effects of acute and chronic immobilization stress on rat Leydig cell steroidogenesis 1996; J Steroid Biochem Mol Biol. 58(3):351-5

McGraw-Hill Higher Education 2005-
http://highered.mcgrawhill.com/sites/0072556781/student_view0/chapter31/animatio_quiz_4.html

McLachlan, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, De Kretser DM, Pratis K and Robertson DM. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys and man 2002; Recent Progress in Hormone Research 57:149-179

Meyer TE and Habener JF. Cyclic AMP response element binding protein CREB and modulator CREM are product of distinct genes 1992; Nucleic Acids Res. 20(22):6106.

Meyer TE, Waeber G, Lin J, Beckmann W and Habener JF. The promoter of the gene encoding 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element binding protein contains cAMP response elements: evidence for positive autoregulation of gene transcription 1993; Endocrinology 132(2):770-80.

Miller RS, Wolfe A, He L, Radovick S and Wondisford FE. CREB binding protein (CBP) activation is required for luteinizing hormone beta expression and normal fertility in mice 2012; *Mol Cell Biol.* 32(13):2349-58

Miman O, Kusbeci OY, Aktepe OC and Cetinkaya Z. The probable relation between *Toxoplasma gondii* and Parkinson's disease 2010; *Neurosci Lett.* 475(3):129-31

Minárovits J. Microbe-induced epigenetic alterations in host cells: The coming era of patho-epigenetics of microbial infections 2009; *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 56 (1), pp. 1–19

Mita M, Price JM, Hall PF. Stimulation by follicle-stimulating hormone of synthesis of lactate by Sertoli cells from rat testis 1982; *Endocrinology* 110(5):1535-41.

Moberg GP. Influence of stress on reproduction: Measure of well-being? *Animal Stress*. Bethesda: Am Physiol Soc, 1985.

Moberg GP. Problems in defining stress and distress 1987; *J Am Vet Med Assn* 191

Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P. . Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER an early response repressor 1993; *Cell.* 75(5):875-86.

Monaco L, Foulkes NS and Sassone-Corsi P. Pituitary follicle-stimulating hormone (FSH) induces CREM gene expression in Sertoli cells: involvement in long-term desensitization of the FSH receptor 1995; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 92, pp. 10673-10677.

Montminy M. Transcriptional regulation by cyclic AMP 1997; *Annu Rev Biochem.* 66:807-22.

Montoya JG and Liesenfeld O. Toxoplasmosis 2004; *Lancet* 363:1965-76.

Nantel F, Monaco L, Foulkes NS, Masquillier D, LeMeur M, Henriksen K, Dierich A, Parvinen M and Sassone-Corsi P. Spermiogenesis deficiency and germ-cell apoptosis in CREM-mutant mice 1996; *Nature* 380, 159 - 162

Nanassy L and Carrell DT. Abnormal methylation of the promoter of CREM is broadly associated with male factor infertility and poor sperm quality but is improved in sperm selected by density gradient centrifugation 2011; *Fertility and Sterility* Vol. 95, No. 7

Navarra P, Tsagarakis S, Faria MS, Rees LH, Besser GM and Grossman AB. Interleukins-1 and -6 stimulate the release of corticotropin-releasing hormone-41 from rat hypothalamus in vitro via the eicosanoid cyclooxygenase pathway 1991. *Endocrinology* 128 37–44.

Oakes CC, La Salle S, Smiraglia DJ, Robaire B and Trasler JM. Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells 2007; *Dev Biol.* 307(2):368-79

Packer AI, Besmer P, Bachvarova RF. Kit ligand mediates survival of type A spermatogonia and dividing spermatocytes in postnatal mouse testes 1995; *Mol Reprod Dev.* 42(3):303-10

Palermo I, Litrico L, Emmanuele G, Giuffrida V, Sassone-Corsi P, De Cesare D, Maria Fimia G, D'Agata R, Calogero AE, Travali S. Cloning and expression of activator of CREM in human testicular tissue 2001; *Biochem Biophys Res Commun.* 283(2):406-11.

Paradowska AS, Miller D, Spiess AN, Vieweg M, Cerna M, Dvorakova-Hortova K, Bartkuhn M, Schuppe HC, Weidner W, Steger K. Genome wide identification of promoter binding sites for H4K12ac in human sperm and its relevance for early embryonic development 2012; *Epigenetics* 7(9).

Paschos K and Allday MJ. Epigenetic reprogramming of host genes in viral and microbial pathogenesis 2010; *Trends in Microbiology*, Vol. 18, No. 10

Pierce J. G. and Parsons T. F. Glycoprotein hormones: structure and function 1981; *Annual Review of Biochemistry* 50, 465–495

Protokol *Biotage*- Robert England and Monica Pettersson- *Quantitative analysis of methylation at multiple CpG sites by Pyrosequencing*

Protokol k soupravě *DNA Modification Kit* od společnosti *Sigma Aldrich*

Protokol k soupravě *GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit* od společnosti *Sigma Aldrich*

Protokol k soupravě *Methylated DNA Quantification Kit* od společnosti *Sigma Aldrich*

Protokol k soupravě *PyroMark PCR Kit* od společnosti *Qiagen*

Protokol *ST AIA–PACK LH II* od společnosti *Tosoh*

Protokol *Varionostic Pyrosequencing – a service provided*

Pyro Mark Virtual Demo-
<http://www.qiagen.com/media/pyrosequencing/20120106/index.html>

Radke JR, Eibs CA and Fox PD. Host cell-directed interactions with *Toxoplasma* influence pathogenesis 2007; *Microbe*, Volume 2, Number 5

Rajender S and Agarwal A. Aberrant epigenetic modifications in male infertility 2011; *The Open Reproductive Science Journal*, 3, 57-64

Rannikki AS, Zhang FP and Huhtaniemi IT. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in the rat testis and ovary 1995; *Mol Cell Endocrinol.* 107(2):199-208

Reddy PM and Reddy PR. Differential regulation of DNA methylation in rat testis and its regulation by gonadotropic hormones 1990; *J Steroid Biochem.*; 35(2):173-8.

Rivier C, Rivier J and Vale W. Stress-induced inhibition of reproductive functions: role of endogenous corticotropin-releasing factor 1986; *Science* 231(4738):607-9

Rivier C and Rivest S. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms 1991; *Biology of reproduction* 45, 523-532

- Roesler WJ, Vandenbark GR and Hanson RW. Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription 1988; J Biol Chem 263(19):9063-6.
- Rodríguez JB. Keep cycling or die: The role of germ cell apoptosis in spermatogenesis 2006; http://www.andrology.org/library/downloads/BR_summary.pdf
- Rossi P, Dolci S, Albanesi C, Grimaldi P, Ricca R, Geremia R. Follicle-stimulating hormone induction of steel factor (SLF) mRNA in mouse Sertoli cells and stimulation of DNA synthesis in spermatogonia by soluble SLF 1993; Dev Biol. 155(1):68-74.
- Rousseaux S, Caron C, Govin J, Lestrat C, Faure AK and Khochbin S. Establishment of male-specific epigenetic information 2005; Gene. 31;345(2):139-53. Epub 2005 Jan 25.
- Ruppert S, Cole TJ, Boshart M, Schmid E and Schütz G. Multiple mRNA isoforms of the transcription activator protein CREB: generation by alternativesplicing and specific expression in primary spermatocytes 1992; EMBO J. 11(4):1503-12.
- Ruwanpura SM, McLachlan RI and Meachem SJ. Hormonal regulation of male germ cell development 2010; Journal of Endocrinology 205, 117–131
- Sarge KD and Cullen KE. Regulation of hsp expression during rodent spermatogenesis 1997; Cell. mol. life sci. 53 (1997) 191–197
- Sassone-Corsi P. Transcription factors responsive to cAMP 1995; Annu Rev Cell Dev Biol. 11:355-77.
- Sassone-Corsi P. CREM: a master switch governing male germ cells differentiation and apoptosis 1998; Semin Cell Dev Biol. 9(4):475-82.
- Scobey M, Bertera S, Somers J, Watkins S, Zeleznik A and Walker W. Delivery of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein (creb) mutant to seminiferous tubules results in impaired spermatogenesis 2001; Endocrinology;142(2):948-54.
- Shaha Ch, Tripathi R and Mishra DP. Male germ cell apoptosis: regulation and biology 2010; Phil. Trans. R. Soc. B 365, 1501–1515
- Sharpe RM, McKinnell Ch, Kivlin C and Fisher JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood 2003; Reproduction 125, 769–784
- Silva NM, Vieira JC, Carneiro CM and Tafuri WL . Toxoplasma gondii: the role of IFN-gamma, TNFRp55 and iNOS in inflammatory changes during infection 2009; Exp Parasitol.123(1):65-72
- Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, Baltogiannis D, Giannakis D and Pardalidis N. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis 2008. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, Volume 109, Issues 3-5
- Somers JP, DeLoia JA, Zeleznik AJ. Adenovirus-directed expression of a nonphosphorylatable mutant of CREB (cAMP response element-binding protein) adversely

affects the survival, but not the differentiation, of rat granulosa cells 1999; *Mol Endocrinol.* 13(8):1364-72.

Steger K. Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids 1999; *Anatomy and embryology* Volume 199, Number 6, 471-487,

Stehle JH, Foulkes NS, Molina CA, Simonneaux V, Pévet P, Sassone-Corsi P. Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland 1993; *Nature* 365(6444):314-20.

Stifko TR, Smith HV, Rose JB. Emerging parasite zoonoses associated with water and food 2000; *International Journal for Parasitology* 30: 1379±1393

Suire S, Fontaine I, Guillou F. Follicle stimulating hormone (FSH) stimulates transferrin gene transcription in rat Sertoli cells: cis and trans-acting elements involved in FSH action via cyclic adenosine 3',5'-monophosphate on the transferrin gene 1995; *Mol Endocrinol.* 9(6):756-66.

Tan Y, Rouse J, Zhang A, Cariati S, Cohen P, Comb MJ. FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2 1996; *EMBO J.* 15(17):4629-42.

Tarulli GA, Stanton PG, Lerchl A, Meachem SJ. Adult sertoli cells are not terminally differentiated in the Djungarian hamster: effect of FSH on proliferation and junction protein organization 2006; *Biol Reprod.* 74(5):798-806

Tarulli GA, Stanton PG and Meachem SJ. Is the Adult Sertoli Cell Terminally Differentiated? 2012; *BOR Papers in Press* DOI:10.1095/biolreprod.111.095091

Tenter AM, Heckeroth AR and Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans 2000; *Int J Parasitol.* November ; 30(12-13): 1217–1258

Terpsidis KI, Papazahariadou MG, Taitzoglou IA, Papaioannou NG, Georgiadis MP, Theodoridis Ith. *Toxoplasma gondii*: Reproductive parameters in experimentally infected male rats 2009; *Experimental Parasitology* 121 238–241

Torrey EF, Bartko JJ, Lun ZR and Yolken RH Antibodies to *Toxoplasma gondii* in patients with schizophrenia: a meta-analysis 2007; *Schizophr Bull.* 33(3):729-36

Tsunekawa N, Nishida T and Fujimoto H. Expression of the Spermatid-Specific Hsp70 Antigen is Conserved in Mammals Including Marsupials 1998. *J Vet Med Sci.* 61(4):381-8.

Tsunekawa N, Matsumoto M, Tone S, Nishida T, Fujimoto H. The Hsp70 homolog gene, Hsc70t, is expressed under translational control during mouse spermiogenesis 1999; *Molecular Reproduction and Development* Volume 52, Issue 4, pages 383–391

Ueda T, Abe K, Miura A, Yuzuriha M, Zubair M, Noguchi M, Niwa K, Kawase Y, Kono T, Matsuda Y, Fujimoto H, Shibata H, Hayashizaki Y and Sasaki H. The paternal methylation imprint of the mouse H19 locus is acquired in the gonocyte stage during foetal testis development. 2000; *Genes Cells.* 5(8):649-59.

Unoki M, Brunet J, Mousli M. Drug discovery targeting epigenetic codes: the great potential of UHRF1, which links DNA methylation and histone modifications, as a drug target in cancers and toxoplasmosis 2009; *Biochem Pharmacol.* 78(10):1279-88.

Vreeburg JT, de Greef WJ, Ooms MP, van Wouw P and Weber RF. Effects of adrenocorticotropin and corticosterone on the negative feedback action of testosterone in the adult male rat 1984; *Endocrinology* 115(3):977-83

Vreeburg JT, Samaun K, Verkade HJ, Verhoef P, Ooms MP and Weber RF. Effects of corticosterone on the negative feedback action of testosterone, 5 alpha-dihydrotestosterone and estradiol in the adult male rat 1988; *J Steroid Biochem* 29(1):93-8

Waeber G and Habener JF. Novel testis germ cell-specific transcript of the CREB gene contains an alternatively spliced exon with multiple in-frame stop codons 1992; *Endocrinology* 131(4):2010-5.

Waeber G, Meyer TE, LeSieur M, Hermann HL, Gerardt N and Habener JF. Developmental stage-specific expression of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein CREB during spermatogenesis involves alternative exon splicing 1991; *Molecular Endocrinology* Vol 5 No. 10

Walker WH, Sanborn BM, Habener JF. An isoform of transcription factor CREM expressed during spermatogenesis lacks the phosphorylation domain and represses cAMP-induced transcription 1994; *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(26):12423-7.

Walker WH, Fucci L and Habener JF. Expression of the gene encoding transcription factor cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) response element-binding protein (CREB): regulation by follicle-stimulating hormone-induced cAMP signaling in primary rat Sertoli cells 1995; *Endocrinology*, 136(8):3534-45.

Walker WH, Habener JF. Role of transcription factors CREB and CREM in cAMP-regulated transcription during spermatogenesis 1996; *Trends Endocrinol Metab.* 7(4):133-8.

Walker WH, Daniel PB and Habener JF. Inducible cAMP early repressor ICER down-regulation of CREB gene expression in Sertoli cells 1998. *Mol Cell Endocrinol.* 25;143(1-2):167-78.

Walker WH. Molecular Mechanisms controlling Sertoli cell proliferation and differentiation 2003; *Endocrinology* 144(9):3719-3721

Walker WH and Cheng J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells 2005; *Reproduction* 130(1):15-28.

Ward IL and Weisz J. Differential effects of maternal stress on circulating levels of corticosterone, progesterone, and testosterone in male and female rat fetuses and their mothers 1984; *Endocrinology* 114(5):1635-44

Webster JP, Brunton CF and MacDonald DW. Effect of *Toxoplasma gondii* upon neophobic behaviour in wild brown rats, *Rattus norvegicus* 1994; *Parasitology*. 109 (Pt 1):37-43

Webster KE, O'Bryan MK, Fletcher S, Crewther PE, Aapola U, Craig J, Harrison DK, Aung H, Phutikanit N, Lyle R, Meachem SJ, Antonarakis SE, de Kretser DM, Hedger MP, Peterson

P, Carroll BJ and Scott HS. Meiotic and epigenetic defects in Dnmt3L-knockout mouse spermatogenesis 2005; Proc Natl Acad Sci USA 102(11):4068-73

Weinbauer GF, Behr R, Bergmann M and Nieschlag E. Testicular cAMP responsive element modulator (CREM) protein is expressed in round spermatids but is absent or reduced in men with round spermatid maturation arrest 1998; Molecular Human Reproduction vol.4 no.1 pp. 9–15

Weinbauer GF and Wessels J. 'Paracrine' control of spermatogenesis 1999; Andrologia 31(5):249-62.

Welsh TH Jr and Johnson BH. Stress-induced alterations in secretion of corticosteroids, progesterone, luteinizing hormone, and testosterone in bulls 1981; Endocrinology 109(1):185-90

Welsh TH Jr, Randel RD and Johnson BH. Interrelationships of serum corticosteroids, LH, and testosterone in male bovine 1981; Arch Androl. 6(2):141-50

Wistuba J, Stukenborg JB, Luetjens CM. Mammalian spermatogenesis 2007; Functional development and embryology 1(2), 99-117

Wu GY, Deisseroth K, Tsien RW. Activity-dependent CREB phosphorylation: convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen-activated protein kinase pathway 2001; Proc Natl Acad Sci U S A. 98(5):2808-13.

Wu W, Shen O, Qin Y, Niu X, Lu Ch, Xia Y, Song L, Wang S and Wang X. Idiopathic Male Infertility Is Strongly Associated with Aberrant Promoter Methylation of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) 2010; PLoS ONE Volume 5 | Issue 11

Yang R, Hou Y, Zhao J, Liu Z, Zhang Q, Rao H. Effect of Toxoplasma Infection on the Apoptosis of Sperm in Mice 2006; Chinese Journal of Zoonoses

Zenner L, Darcy F, Capron A and Cesbron-Delauw MF. Toxoplasma gondii: kinetics of the dissemination in the host tissues during the acute phase of infection of mice and rats 1998; Exp Parasitol. 90(1):86-94

Zhou Y, Lu Y, Hu Y et al. Experimental study of influence of Toxoplasma tachyzoites on human sperm motility parameters in vitro 2003; Chinese Journal of Zoonoses

Zhu H, Li K, Liang J, Zhang J and Wu Q. Changes in the levels of DNA methylation in testis and liver of SD rats neonatally exposed to 5-aza - 2 - deoxycytidine and cadmium 2011; J. Appl. Toxicol.; 31: 484-495

http://www.biocarta.com/pathfiles/h_crempathway.asp#

http://www.dshs.state.tx.us/LAB/serology_cf.shtm

http://www.genego.com/map_1580.php

<http://www.qiagen.com/products/pyromarkq96md.aspx>

<http://www.pharmacistsworld.com/forum/showthread.php?t=17120&page=12>

http://php.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=File:Testis_histology_2.jpg

http://php.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=ANAT2341_Lab_1_-_Spermatogenesis

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/mdq1?lang=en®ion=CZ>

<http://wikipedia.infostar.cz/d/de/deamination.html>

<http://www.wikiskripta.eu/images/6/6b/Schema-ELISA-capture.png>